

RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX

DANS LES CRACHATS

MÉTHODES DE COLORATION ET DE CONCENTRATION

THÈSE

POUR

l'Obtention du Diplôme de Docteur de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 21 NOVEMBRE 1925

par

Marguerite MAILLARD

Pharmacien de la Faculté de Nancy
Médaille d'Or
Ex-Interne de l'Hôtel-Dieu d'Angers

Née à Romorantin (Loir-et-Cher) le 17 Octobre 1898

Examineurs de la Thèse	{	MM. BRUNTZ, <i>Président.</i>	{	<i>Juges.</i>
		LASSEUR		
		VERNIER		

ANGERS

IMPRIMERIE DU COMMERCE
3, RUE SAINT-MAURILLE, 3

—
1925



Digitized by the Internet Archive
in 2026

RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX

DANS LES CRACHATS

MÉTHODES DE COLORATION ET DE CONCENTRATION

THÈSE

POUR

l'Obtention du Diplôme de Docteur de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 21 NOVEMBRE 1925

par

Marguerite MAILLARD

Pharmacien de la Faculté de Nancy

Médaille d'Or

Ex-Interne de l'Hôtel-Dieu d'Angers

Née à Romorantin (Loir-et-Cher) le 17 Octobre 1898

Examineurs de la Thèse	{	MM. BRUNTZ, <i>Président.</i>	{	<i>Juges.</i>
		LASSEUR		
		VERNIER		

ANGERS

IMPRIMERIE DU COMMERCE

3, RUE SAINT-MAURILLE, 3

1925

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN : M. BRUNTZ, *, †, I Q, O †, †, †.

ASSESEUR : M. PASTUREAU, *, Q.

PROFESSEURS :

MM. FAVREL, *, I Q.....	Chimie organique.
GRÉLOT, *, I Q, †.....	Pharmacie galénique.
BRUNTZ, *, †, I Q, O †, †, †.	Matière médicale.
DOURIS, I Q, †, †.....	Toxicologie et analyse chimique.
PASTUREAU, *, Q.....	Pharmacie chimique.
SEYOT, *, †, I Q, †.....	Histoire naturelle.
LASSEUR, I Q, †.....	Microbiologie.

AGRÉGÉ LIBRE :

M. GIRARDET, I Q.....	Chimie et Toxicologie.
-----------------------	------------------------

CHARGÉS DE COURS :

MM. FAVREL, *, I Q.....	Chimie minérale et minéralogie.
GRÉLOT, *, I Q, †.....	Hydrologie.
BRUNTZ, *, †, I Q, O †, †, †.	Zoologie.
DOURIS, Q, †, †.....	Chimie biologique.
PILLOT, I Q.....	Physique
VERNIER, I Q.....	Hygiène.
RENARD, I Q.....	Législation et Déontologie.

CHEFS DE TRAVAUX :

MM. VERNIER, I Q.....	Microbiologie et Parasitologie.
GILLOT, Q, †.....	Pharmacie.
CORDEBARD, Q, †.....	Toxicologie, Chimie, Analyse chimique.
STEIMETZ.....	Micrographie.
PILLOT, I Q, chargé de trav.	Physique.

SECRÉTARIAT :

MM. BERTRAND, I Q.....	Secrétaire.
F. LAMBERT DES CILLEULS, *, †, I Q.	Secrétaire honoraire.
ROVEL, *, I Q.....	Secrétaire en disponibilité.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les improuver.



A M. LE PROFESSEUR BRUNTZ

**Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy,
Chevalier de la Légion d'Honneur.**

INTRODUCTION

La Tuberculose s'est, depuis nombre d'années, répandue de façon si inquiétante qu'on la considère à bon droit comme un danger social. Le corps médical et tous les corps savants se sont émus et après eux le public et enfin le pouvoir dans tous les Etats. Partout la lutte est ouverte, est organisée ou s'organise. Mais il ne suffit pas d'arracher à la mort ceux que déjà le mal a terrassés, il importe de préciser les diagnostics chez les malades qui sont encore aux premiers stades de la maladie, ou qui sont simplement suspects : dépister les porteurs de germes qui peuvent être un fléau pour leur entourage et ceux qui ne sont peut-être que les victimes de cet entourage, tel est le rôle des dispensaires de lutte antituberculeuse aujourd'hui fort répandus.

La présence du Bacille de KOCH reconnue dans les crachats paraît, jusqu'à présent, le seul critérium certain de la tuberculose. Aussi à l'examen clinique et radioscopique du malade, le laboratoire, auxiliaire du dispensaire, apporte son indispensable concours.

L'examen microscopique des crachats, après coloration spécifique, est, au laboratoire, le mode de recherche le plus simple et le plus courant ; mais il est acquis qu'un examen microscopique négatif n'est pas toujours une preuve de l'absence des Bacilles dans les expectorations : si après avoir étudié longuement et à diverses reprises les crachats d'un malade on n'aboutit qu'à un résultat négatif, on peut douter encore. Il faut donc, soit en vue d'instituer un traitement précoce, soit en vue de prendre des mesures prophylactiques, recourir à des procédés en même temps sensibles et rapides de la recherche du Bacille tuberculeux.

Un procédé sûr, aux indications indiscutables, consiste dans l'inoculation au cobaye des produits suspects ; si le produit inoculé est

bacillifère, le Cobaye est tuberculisé, et le simple examen microscopique des frottis de sa rate, de ses ganglions, révèle toujours de nombreux Bacilles tuberculeux ; mais si ce procédé donne une certitude, il exige en moyenne au moins deux mois d'attente, il est en outre coûteux et nécessite une installation que ne possèdent pas tous les laboratoires.

Par un autre procédé, assez récemment mis au point, on a recours à l'ensemencement des crachats suspects sur un milieu électif et plus particulièrement le nouveau milieu de PETROFF ; mais c'est une préparation longue et une méthode qui ne donne encore que des résultats incertains.

On s'en tient donc le plus souvent au procédé qui fut d'abord préconisé et mis en pratique dès les premières années qui suivirent la découverte de KOCH : c'est la concentration des Bacilles qui consiste, après un traitement approprié des crachats, à grouper les Bacilles sous le volume le plus réduit. Beaucoup plus rapide que les deux procédés envisagés plus haut, la concentration des Bacilles a été l'objet de nombreux travaux ; des techniques fort variées ont été envisagées, essayées et publiées.

C'est à l'examen microscopique direct des crachats et aux procédés si nombreux de concentration que j'ai limité mes recherches.

La première partie de ce travail comprend :

Les procédés d'étalement et de fixation des préparations ;

Un aperçu historique ;

L'exposé des techniques que j'ai expérimentées ;

La critique de ces techniques ;

L'étude de quelques techniques récentes et de la technique classique de ZIEHL.

La deuxième partie est consacrée aux procédés de concentration :

But des procédés de concentration ;

Revue des travaux antérieurs ;

Exposé des techniques que j'ai expérimentées ;

Critique de ces techniques ;

Etude de la méthode de DESPEIGNES.

Je consacre un dernier chapitre à des essais de numérations au réseau oculaire, que j'ai entrepris ; essais poursuivis en recourant dans chaque cas, à des procédés divers de coloration du Bacille tuberculeux, et qui m'ont permis d'établir des comparaisons numériques entre les résultats fournis par l'examen microscopique direct des crachats et ceux que donne l'examen des préparations obtenues après concentration de ces mêmes crachats. Enfin, je donne mes conclusions.

L'idée de cet ouvrage m'a été suggérée par mon Maître, M. le Professeur LASSEUR, professeur de Microbiologie à la Faculté de Nancy, qui a bien voulu, pendant mon séjour près de cette Faculté, me manifester le plus grand intérêt et guider avec sa haute compétence la marche de mon travail. Je lui dois une toute particulière reconnaissance que j'ai hâte de lui exprimer.

Je suis heureuse de pouvoir dire aussi toute ma gratitude respectueuse à M. le Doyen BRUNTZ, dont la paternelle sollicitude est si appréciée et si réconfortante à tous les Etudiants de la Faculté. Ses directions et ses conseils m'ont été particulièrement chers et profitables. Il m'a enfin fait l'honneur dont je suis profondément touchée et fière d'accepter la présidence de cette thèse.

Mes recherches, commencées à Nancy, ont été poursuivies au Laboratoire de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie d'Angers que dirige M. le Professeur Paul PAPIN. Après m'avoir accueillie comme son auxiliaire pendant deux années dans son laboratoire et initiée à diverses études bactériologiques et histologiques ; après m'avoir quotidiennement guidée, même ensuite, alors qu'étant Interne à l'Hôtel-Dieu, je fréquentais encore son Laboratoire, M. le Professeur P. PAPIN, quand j'entrepris cette thèse, mit à ma disposition avec une infinie bonne grâce et un admirable dévouement, les ressources matérielles de l'Etablissement qu'il dirige et, plus précieuses encore, celles de son savoir tant apprécié. Je lui voue toute ma reconnaissance.

Mes remerciements vont aussi, avec une respectueuse cordialité, à tous les Maîtres près de qui j'ai acquis les connaissances que j'ai

en Pharmacie : à MM. les Professeurs de la Faculté de Nancy, à M. le Directeur A. BOQUEL, Directeur de l'Ecole d'Angers, à MM. les Professeurs de cette Ecole et, en particulier, à M. le Professeur GAUDIN, Chef du Laboratoire, qui, pendant une collaboration de plusieurs années, me prodigua chaque jour ses avis avec une exquise bonté et à M. le Professeur A. FOUCHET, qui guida si sûrement mes premiers pas dans les études pharmacologiques.

RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX

DANS LES CRACHATS

MÉTHODES DE COLORATION ET DE CONCENTRATION

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

ÉTALEMENT. — FIXATIONS. — GÉNÉRALITÉS

On doit examiner les microbes dans les cultures ou dans les produits pathologiques : 1° à l'état frais ; 2° après coloration ; mais, dans les crachats et le pus, l'examen se fait uniquement après coloration.

Le produit infecté ou suspect est étalé sur lame, puis séché, enfin « fixé ». La fixation a pour but d'assurer la parfaite adhérence de la préparation à la lame de verre ; mais, dans la majorité des cas, les germes sont tués.

Les crachats, seuls produits que nous voulions envisager ici, doivent être, de préférence, recueillis le matin, car tel malade n'expectore pas de Bacilles au cours de la journée qui en rejette sûrement chaque matin à son réveil et les crachats alors risquent moins d'être pollués de particules alimentaires.

Salivaires, muqueux, aérés dans les cas de tuberculose à son début, purulents chez les cavitaires, les crachats se présentent sous des aspects très divers ; ils peuvent être muco-purulents, séro-muqueux, sanguinolents, sanglants même.

Directement, dans le récipient qui les a recueillis, ou dans une boîte de PETRI, on prélève sur les crachats ce qu'en emporte un fil de platine ou une pince. S'ils sont muco-purulents, on s'empare des particules purulentes ; s'ils sont très liquides, les mucosités étant difficilement saisissables, on les verse dans une boîte de PETRI sur du papier-filtre plusieurs fois replié : le papier absorbe le liquide et c'est à sa surface qu'on râcle les parties ayant quelque consistance.

Tenu à l'extrémité ou du fil de platine ou de la pince préalablement stérilisés à la flamme d'un bec BUNSEN, le fragment de crachat est déposé et étalé avec le fil de platine sur une lame de verre très propre, puis fil ou pince sont immédiatement portés au rouge et stérilisés à nouveau. On a ainsi ce qu'on appelle une « *préparation* ».

Au bain d'acide chromique qui fixait la préparation en tuant le bacille, EHRLICH (20)¹ substitua la dessiccation par un séjour de plusieurs heures à une température de 120°, mais KOCH (42) prouva que les mêmes résultats sont obtenus après un triple passage lent à la flamme qui réalise la fixation mécanique des albumines et c'est ainsi qu'on procède généralement aujourd'hui. Certes, on risque bien ainsi d'altérer les plastides, mais, dès qu'on s'en tient à une recherche de germes et non à un examen cytologique, cela a peu d'importance.

Le Bacille tuberculeux prend très difficilement les couleurs d'aniline ; mais, dès qu'il les a fixées, il les retient énergiquement. Il résiste à l'action des divers réactifs décolorants et particulièrement à celle des acides. L'*acido-résistance* du Bacille tuberculeux coloré est sa caractéristique essentielle. J'étudie dans un chapitre spécial cette acido-résistance en mentionnant les diverses hypothèses émises sur ses causes.

L'acido-résistance du Bacille tuberculeux est à la base des techniques proposées pour sa coloration, ainsi que le sont, accessoirement, son *alcoolo-résistance*, sa *résistance aux solutions salines*. Colorer fortement la préparation, puis décolorer à l'aide de produits sans action notable sur le seul Bacille, recolorer alors les parties

¹ Les numéros entre parenthèses renvoient à l'*Index bibliographique*.

figurées ou non qui constituent ce qu'on appelle le fond avec une couleur différente : tel est le principe suivi.

Les colorants ordinairement employés sont des solutions hydro-alcooliques de couleurs basiques d'aniline additionnées d'un mordant et que l'on fait agir de préférence à chaud sur la préparation. Les décolorants sont des acides, de l'alcool, des solutions salines. Les colorants de contraste sont simplement des solutions froides imprégnant légèrement les autres éléments du crachat.

Il n'est pas sans intérêt de suivre pas à pas les efforts des chercheurs qui sont arrivés, par des essais le plus souvent empiriques, à colorer électivement le Bacille tuberculeux, à créer des techniques spéciales, à les perfectionner. Une revue de toutes ces expériences parues depuis la découverte du Bacille de Koch nous permettra d'apprécier le chemin parcouru ; aussi bien, mes efforts viennent-ils modestement en cette matière s'ajouter à tant d'autres.

CHAPITRE II

HISTORIQUE DES COLORATIONS ¹

La découverte, en 1882, par KOCH du Bacille qui porte son nom, conséquence des admirables travaux du Grand PASTEUR, eut un prodigieux retentissement : l'Humanité tout entière, victime réelle ou éventuelle d'un « *mal qui répand la terreur* », fut prise d'un grand espoir ; l'armée des savants se tourna attentive vers le fait nouveau et s'attacha, avec une ardeur particulière, à la lutte contre le fléau.

Ne fallait-il pas d'abord, reconnaître le Bacille, étudier ses propriétés, le dépister partout où il se trouve ? ce fut, de 1882 à 1888, dans tous les laboratoires et particulièrement dans ceux d'Allemagne une belle émulation qui est d'ailleurs loin de s'éteindre.

Mais si le concours des gens de science et de dévouement est largement assuré, de puissants moyens matériels sont nécessaires et ce n'est qu'à grands frais qu'on les peut avoir. Malgré les appels généreux de la grande Presse qui a groupé avec l'obole des humbles, le million de riches philanthropes, les laboratoires souffrent encore, en France au moins, de la pauvreté ; et les subsides de l'Etat épuisés par une récente guerre seront encore pour longtemps insuffisants.

Comme c'est grâce à des procédés de coloration qu'on arrive à mettre en évidence le Bacille tuberculeux, on s'appliqua de tous côtés à l'étude des colorants les plus rapides et les plus précis. Les recherches se continuent, mais on peut considérer que dès 1888, on était en possession de techniques sensibles et pratiques.

Nous allons succinctement et d'abord dans l'ordre chronologique,

¹ M. le Professeur LASSEUR a mis à ma disposition une bibliographie complète de l'histoire des colorations. Cette documentation a été extraite entièrement des travaux originaux.

exposer les essais des principaux bactériologistes et les résultats publiés par chacun d'eux. Nous envisagerons le choix et l'emploi des produits utilisés, puis quelques détails de manipulations d'ordre physique, quelle que soit la nature des colorants.

La découverte de KOCH coïncide avec l'emploi de plus en plus généralisé dans les laboratoires d'histologie des couleurs d'aniline connues depuis 1870, mais surtout utilisées après les travaux d'HERMANN publiés en 1875 (38). La pureté, la netteté des colorations obtenues par cet auteur avaient tout de suite attiré l'attention : on s'accorde pour les attribuer au procédé très simple qui consiste à dissoudre les couleurs, non dans l'alcool ou dans l'eau, mais dans un mélange d'alcool et d'eau à parties égales.

Emploi
des couleurs
d'aniline.

« Dès 1875, WEIGERT avait attiré l'attention sur la coloration des Bactéries par les colorants d'aniline, mais son travail n'eut pas grande répercussion.

Il faut attendre 1877, époque à laquelle KOCH (40) déclare que les couleurs d'aniline sont les colorants par excellence des Bactéries, qu'il s'agisse de la différenciation ou de la mise en évidence des germes.

Ces colorants entrèrent facilement dans la pratique grâce aux faits suivants :

EHRlich (20) avait montré que pour le sang, le pus, etc., on pouvait utiliser le chauffage à 120-130° pendant plusieurs heures comme moyen de fixation. C'était une simplification notable de la technique des colorations, mais cette simplification s'accroîtra encore, lorsque KOCH aura démontré que les Bactéries, le pus, les crachats peuvent être fixés en 2 ou 3 minutes, et dans sa conférence du 24 mars 1882, KOCH propose de « fixer » en passant les préparations trois fois et lentement dans la flamme non éclairante du gaz : c'est l'abandon de la fixation à l'acide chromique.

Procédés
de fixation.

KOCH colore le Bacille tuberculeux,

1° En traitant les coupes durant 24 heures par une solution aqueuse de bleu de méthylène alcalinisée par la potasse ;

2° En différenciant par coloration à la résuline. Sciemment ou non, KOCH fait intervenir une idée nouvelle : celle de déplacement en teinture.

Premier pro-
cédé de Koch.
Déplacement
en teinture.

Procédé
d'Ehrlich.
Décoloration
par un acide.

Mais l'application qu'il fait des phénomènes de déplacement ne paraît pas avoir retenu l'attention à cette époque. Par contre, EHRLICH fut frappé des résultats de coloration obtenus par KOCH. Il attribue à l'alcalinité le succès de la méthode de KOCH et propose de remplacer KOH par l'aniline. Il savait, depuis 1875, que l'addition d'aniline au violet de méthyle donne plus de brillant (23).

Or, chose inattendue, les tissus colorés à l'aide de la solution alalinée résistaient à l'action de la vésuvine.

Pour arriver à la décoloration, il fallait avoir recours aux acides, ce qui conduisit EHRLICH (21) à utiliser $\text{N O}^3 \text{H}$ dilué au tiers. En opérant ainsi, il réussit à colorer électivement le Bacille tuberculeux, chose que KOCH n'avait pu faire (Conférence du 1^{er} mai 1882) » ¹.

L'emploi d'un acide dans les techniques de coloration n'était pas méthode nouvelle : EHRLICH lui-même (20) avait déjà coloré les tissus par une solution de dahlia dans un mélange d'alcool et d'acide acétique glacial et WEIGERT (75) avait fait suivre la surcoloration des coupes réalisée par une solution aqueuse de violet de méthyle ou de fuchsine d'une rapide décoloration dans l'acide acétique faible, puis dans l'alcool.

Ce procédé avait d'ailleurs été adopté par KOCH.

L'aniline
mordant.

L'addition de l'aniline imaginée par EHRLICH (21) ne remplaçait pas l'alcali que KOCH avait fait entrer dans sa solution de bleu de méthylène : l'eau anilinée n'a ici que le rôle d'un mordant qui favorise l'adsorption du colorant par les Bactéries et rend leur décoloration plus difficile. Elle fixe, en effet, la couleur avec une telle intensité qu'EHRLICH dut, pour décolorer les seuls tissus, recourir à un agent énergétique : l'acide nitrique qui décolore les cellules, les germes microbiens divers, mais non le Bacille tuberculeux lui-même.

Acido-
résistance.

C'était la première démonstration d'une propriété jusque-là inconnue mais essentielle du Bacille de la tuberculose coloré, sa grande acido-résistance qui dépasse de beaucoup — quelques-uns seulement, et en particulier celui de la lèpre, mis à part — l'acido-résistance des autres Bacilles, et cette propriété du Bacille de KOCH a permis d'un coup sa mise en évidence dans tous les tissus.

¹ Extrait du Cours de M. le Professeur LASSEUR.

C'était un point acquis d'une grande importance qui donnait une orientation à de nombreux chercheurs dont les travaux parurent en quelques années (de 1882 à 1888).

KOCH (43), abandonnant sa méthode primitive, se rallia bientôt, en 1884, à celle d'EHRlich, tout en la modifiant : il divisa en deux temps le processus de décoloration :

Modification
du procédé
d'Ehrlich
par Koch.

1° Traitement rapide à l'acide azotique ;

2° Traitement de 10 à 15 minutes dans l'alcool à 60°, perfectionnement appréciable qui fait ressortir « l'alcool-résistance » du Bacille tuberculeux.

Dès le début de ses travaux, en 1882, KOCH (42) avait posé en principe que l'alcalinité des solutions colorantes est une condition essentielle du succès, quel que soit d'ailleurs l'alcalin utilisé : potasse, soude, ammoniac.

Influence
de la réaction
des solutions
colorantes.

Se basant sur les travaux de KOCH, EHRlich (21) ajoutant de l'aniline à sa solution n'attendait de ce produit qu'un rôle d'alcalin. Il dut bientôt reconnaître (23) que l'alcalinité n'était pas, comme il l'avait cru après KOCH, une condition nécessaire à la coloration.

ZIEHL, en effet, qui déjà avait obtenu un résultat appréciable avec une simple solution de violet de méthyle additionnée d'acide acétique, démontra (78), en 1882, le contraire en utilisant un sel d'aniline dont l'action décolorante sur une solution de carbonate de soude rougie par la phénolphtaléine prouvait la réaction faiblement acide. Bien mieux, ZIEHL introduisit dans sa solution anilinée de violet de méthyle, de l'acide acétique jusqu'à virage net du papier de tournesol et, dans l'un et l'autre cas, les Bacilles demeuraient fortement colorés.

Vers la même époque d'autres bactériologistes confirmèrent que la réaction des solutions n'est pas le facteur dominant dans la coloration du Bacille tuberculeux.

LICHTHEIM (50) ainsi que de GIACOMI (30) obtinrent une coloration suffisante sans addition d'alcali ou d'aniline ; PETRI (61) colorait même les Bacilles, comme l'avait fait ZIEHL par des solutions acidulées faiblement à l'acide acétique et chercha à prouver, par des réactions à la phénolphtaléine, que les Bacilles n'absorbent pas plus d'alcali que les tissus environnants.

WEICERT (76) et FRAENKEL (26) se rangèrent plus tard à ces avis et BAUMGARTEN (5) s'attacha tout particulièrement à établir que les Bacilles tuberculeux dans les crachats et même dans les coupes peuvent être décelés par une solution colorante aqueuse.

Introduction
du phénol.

EHRlich (23) ayant obtenu des résultats meilleurs avec un violet de méthyle d'une pureté douteuse qu'avec un produit absolument pur, avait été amené à faire entrer l'aniline dans sa solution colorante. De même ZIEHL remarqua un jour que son aniline ne lui donnait pas des résultats constants. Il reconnut que ce produit ne constituait un mordant que lorsqu'il était à l'état impur. Il attribua cette impureté de l'aniline à la présence de phénol. Il substitua donc à sa solution de violet aniliné, un mélange d'une eau saturée de phénol et d'une solution alcoolique à 2 % de violet de méthyle (78).

Dès lors, les regards des bactériologistes se portèrent sur le phénol et toute une classe de corps de la même série qui tous peuvent servir de mordants à l'égard des Bactéries : le plus répandu, à côté de l'aniline et du phénol, fut le thymol.

Dans un travail ultérieur (23), EHRlich préconisa comme mordant un troisième groupe de corps : les aldéhydes (benzaldéhyde, aldéhyde salicylique, vanilline), qui peuvent en effet exalter l'affinité des tissus pour les colorants et l'on avait déjà vu RANVIER faire agir l'aldéhyde formique sur des préparations colorées au carmin.

Aux yeux d'EHRlich (23), seuls, les produits donnant avec le violet de méthyle ou la fuchsine, qu'il adopte au même titre que le violet de méthyle, un mélange huileux, constituent de bons mordants.

Technique
de Ziehl.
Déplacement.

La fuchsine phéniquée devient pour ZIEHL (79) le colorant de prédilection, il propose même pour identifier le Bacille tuberculeux, une technique toute nouvelle, en 1883 : colorer les préparations par la fuchsine phéniquée puis par le bleu de méthylène, sans lavage intermédiaire à l'acide azotique.

ZIEHL, ici comme l'avait fait KOCH (42), utilise le phénomène de déplacement en teinture. La préparation prend, sous l'action de la fuchsine, une teinte uniformément rouge, puis, au contact du bleu de méthylène, les cellules seules perdent l'empreinte de la fuchsine et fixent le bleu. Les Bacilles tuberculeux qui ont fixé la fuchsine

avec une plus grande intensité restent colorés en rouge, tandis que les noyaux et les germes microbiens sont colorés en bleu.

Certains Bacilles toutefois restent bleus et ZIEHL se demande si ce ne sont pas là des Bacilles tuberculeux prenant, dans certaines conditions, une attitude différente vis-à-vis des colorants.

ZIEHL (42) est tout naturellement amené à se demander si, à plus forte raison EHRLICH dont le procédé a une action bien plus énergique, ne risque pas de décolorer par l'acide azotique un certain nombre de Bacilles tuberculeux. Il se livre alors à ce sujet à d'intéressantes expériences.

Il observe au microscope l'action d'une goutte d'acide azotique sur une préparation de Bacilles tuberculeux colorés à la fuchsine : les Bacilles rouges pâlisent, se décolorent peu à peu, inégalement d'abord et disparaissent tous à l'œil au bout de 20 minutes. Une goutte d'eau substituée à l'acide azotique les fait aussitôt réapparaître en rouge et ZIEHL, mettant à diverses reprises alternativement de l'acide azotique, puis de l'eau sur sa préparation, obtient la décoloration des Bacilles puis leur réapparition ; mais leur couleur rouge est de moins en moins intense et ils se montrent de moins en moins nombreux.

Décoloration
par l'acide
nitrique.
Expériences
de Ziehl.

Il recommande alors de n'utiliser que l'acide nitrique très pur, exempt surtout de l'acide nitreux dont l'action décolorante est brutale et de ne le faire agir qu'un temps très court, après avoir, de préférence, plongé la préparation, préalablement dans l'alcool puis dans l'eau ; la décoloration à l'alcool doit être suivie d'un lavage parfait à l'eau. Ainsi, affirme-t-il, les Bacilles restant colorés dans les produits pathologiques peuvent être considérés sans le moindre doute comme Bacilles tuberculeux.

D'autres que ZIEHL modifièrent diversement la méthode d'EHRLICH, qu'ils se soient uniquement préoccupés de la coloration du Bacille tuberculeux ou de celle d'autres Bacilles acido-résistants, celui de la lèpre, ou celui que LUSTGARTEN considéra — à tort d'ailleurs — comme le microbe spécifique de la syphilis. Ces trois Bacilles peuvent être colorés par la même méthode puisqu'ils présentent, à l'égard des colorants les mêmes propriétés. C'est ainsi que DOUTRELEPONT et SCHUTZ (19) colorent les « bacilles de la

Autres
procédés
de coloration
et de
décoloration.

syphilis » ¹ par une solution de violet de gentiane à 1 %, 24 à 48 heures à froid, décolorent par l'acide nitrique à 1/15, puis par l'alcool à 60° ; le fond est teint en rose par la safranine.

Le décolorant d'ALVAREZ et TAVEL est une solution d'acide oxalique à 2 %, leur colorant de contraste la safranine ou l'éosine.

WEIGERT (76) obtient des Bacilles tuberculeux d'un violet intense avec le violet de gentiane ammoniacal.

ORTH (59) propose comme décolorant l'alcool à 70° contenant 1 % d'acide chlorhydrique et BITTER (11), après avoir étudié sur le Bacille de la tuberculose et sur celui de LUSTGARTEN l'action de l'acide nitrique et de l'alcool à des concentrations diverses, est convaincu que l'emploi successif de l'acide nitrique à 1/3 puis de l'alcool à 70° ² est le meilleur des procédés pour caractériser le Bacille tuberculeux qui est, des acido-résistants, le seul alcoolo-résistant.

Coloration
des bacilles
et coloration
de contraste
simultanées.

Le fait de réunir en une même manipulation la coloration des Bacilles et la coloration de contraste fut une innovation due à l'Anglais GIBBES (32) qui colorait en 5 minutes les Bacilles tuberculeux par le mélange d'une solution alcoolique, bleu de méthylène et fuchsine à parties égales, et d'eau anilinée, puis lavait avec de l'alcool contenant 1 % d'acide acétique.

PETRI (61) utilisait un mélange de vert-malachite et de fuchsine.

FRAENKEL (26) à son tour obtint en une seule opération la décoloration des préparations et la coloration de contraste en traitant les préparations colorées à la fuchsine par un mélange d'acide azotique et de bleu de méthylène ou de vert-malachite ou bien encore de vésuvine.

Décolorants
alcalins.

En 1885, GOTTSTEIN (35) attira l'attention sur une nouvelle classe de décolorants : les solutions de sels alcalins et alcalino-terreux, qui n'attaquent pas le Bacille tuberculeux coloré. Le bichromate de potasse, le nitrate d'argent, l'alun, les carbonates et les sulfates alcalins, l'iode de potassium, sans attaquer le Bacille, libèrent en

¹ Inutile d'ajouter que l'agent de la syphilis (*Treponema pallida*) n'a rien de commun avec le germe de LUSTGARTEN.

² Jamais de l'alcool absolu.

le coagulant le colorant des tissus et des cellules : une immersion dans l'alcool entraîne ensuite ce colorant. A vrai dire, GOTTSTEIN présentait un système, la généralisation d'une même propriété chez tous les sels d'un même groupe ; c'était une nouveauté de proposer l'emploi des sels dans la technique de coloration du Bacille tuberculeux, comme GRAM l'avait fait dans la réaction qui porte son nom, en associant à l'iode, l'iodure de potassium. Déjà EHRLICH (22) soucieux de démontrer le bien fondé de la théorie qui lui était chère — *imperméabilité de l'enveloppe du Bacille tuberculeux* — avait remarqué que, coloré par la fuchsine, le Bacille soumis à l'action du bisulfite de soude restait rouge, tandis que la fuchsine teintant les autres parties de la préparation était transformée en leucofuchsine et qu'une solution concentrée d'hyposulfite de soude (22) laissait, après un quart d'heure de contact, une préparation colorée par la fuchsine, complètement incolore apparemment, tandis que le microscope n'y décelait plus que les Bacilles encore d'un rouge vif.

De GIACOMI (30) avait décoloré par le perchlorure de fer concentré, après les avoir lavées avec ce même sel très étendu, des préparations du Bacille de LUSTGARTEN.

L'année même — 1885 — où GOTTSTEIN étudiait l'effet décolorant des solutions salines sur le Bacille tuberculeux, FUTTERER (27) afin d'y déceler le Bacille, laissait les coupes colorées selon la technique d'EHRLICH, quelques minutes dans un bain de chlorure de palladium à 1/500 après traitement rapide à l'alcool contenant un peu d'acide nitrique.

Les sels ont été généralement adoptés comme décolorants dans les techniques proposées pour la coloration des Bacilles de LUSTGARTEN toutes applicables au Bacille tuberculeux. LUSTGARTEN (53) met en évidence son « *Bacille de la syphilis* » dans les coupes en colorant celles-ci soit par la solution d'EHRLICH modifiée par WEIGERT (76) : 11 parties de solution alcoolique concentrée de violet de gentiane pour 100 parties d'eau distillée, 24 heures à froid ou 2 heures à 40°, soit par la fuchsine phéniquée à chaud. Après les avoir lavées à l'alcool absolu, LUSTGARTEN laisse les préparations 10 secondes dans une solution de permanganate de potassium à 1,50 %. Ensuite il les immerge dans une solution d'acide sulfureux obtenue par l'action

de l'acide sulfurique sur du cuivre, et lave à grande eau. LUSTGARTEN fait agir à nouveau permanganate puis acide sulfureux alternativement jusqu'à décoloration.

D'autre part LUSTGARTEN (53) obtint de bons résultats en décolorant par l'hypochlorite de soude.

Laissées 5 minutes dans une solution à demi-saturée de carbonate de potassium, comme le recommande BAUMGARTEN (4), des coupes sont ensuite traitées par l'alcool absolu qui entraîne la couleur du tissu, tandis que les Bacilles tuberculeux restent bien colorés.

Structure
granulée.

La structure granulée du Bacille de la lèpre et celle du Bacille tuberculeux furent mises en évidence en 1886 par LUTZ qui décolorait par l'acide azotique fumant une préparation traitée au violet de gentiane et à l'iode (54) ; elles le furent plus parfaitement encore par UNNA (72). Sans recourir à l'acide, celui-ci put obtenir une coloration de contraste ; à cet effet, après avoir donné aux préparations une teinte bleu foncé par une solution anilinée de pararosaniline, il les plonge quelques secondes dans le mélange iode et iodure de potassium à 5 % et eau oxygénée, puis décolore par l'alcool jusqu'à ce que les grains apparaissent nettement, enfin il traite par la fuchsine anilinée à chaud et décolore par une solution soit de chlorure, soit d'iodure de potassium, puis lave à l'alcool.

Sur les préparations à la fuchsine, les solutions salines décolorantes faibles donnent des résultats qu'on n'obtient sur les préparations au violet de gentiane qu'avec des solutions sensiblement plus fortes.

Dès lors, les techniques qui constituent pour ainsi dire le fond commun des laboratoires sont connues. Les travaux antérieurs à 1888 ont servi de base à toutes les techniques publiées depuis qui sont, le plus souvent, de simples modifications à celle de ZIEHL ou d'EHRlich.

Chauffage
des solutions
colorantes.

Toutefois, une remarque est nécessaire : KOCH avait indiqué qu'on peut obtenir une coloration suffisante en 2 heures à l'étuve à 40° (40), RINDFLEISCH (63), pour la coloration du Bacille tuberculeux réduisit, par la suite à 10 minutes le temps de coloration à 70° en laissant les préparations couvertes de la solution colorante, sur la platine chauffante.

C'est en chauffant à 70° que tous les auteurs qui suivirent ont procédé. On s'en tient le plus souvent au colorant de ZIEHL, solution de fuchsine phéniquée, quitte à varier le décolorant, ou le colorant de contraste, parfois l'un et l'autre.

Ainsi KÜHNE (48) après coloration par la fuchsine phéniquée fait agir sur la préparation une solution à 2 % de chlorhydrate d'aniline, puis décolore par l'alcool ; MULLER (57) décolore par l'eau oxygénée alcalinisée par la soude ; BAYARD (6) par un mélange de glycérine et d'une solution alcoolique d'acide borique ; mais le fond est toujours coloré par le bleu de méthylène.

Modification
à
la technique
de Ziehl.

Comme LUSTGARTEN (53), RONDELLI (64) en 1897 adopte un décolorant sous forme de solution préparée extemporanément, comme nous le verrons plus loin, l'hypochlorite de potasse, oxydant énergétique qui, teignant en brun la préparation, rend inutile l'intervention d'un autre colorant.

La décoloration des préparations et la coloration de contraste réalisées en un seul temps comme nous l'avons dit, d'abord par FRAENKEL (26) et qui le furent ensuite par GABBET (28) furent introduites il y a quelques années dans une technique nouvelle par CÉPÈDE (17) qui substitue à l'acide nitrique de FRAENKEL et à l'acide sulfurique de GABBET, l'acide lactique dans la solution active qu'il nomme « *lacto-bleu* », que SOLLIER et DAVIDOVITCH (67) proposaient naguère de remplacer par un « *lacto vert* » à base de vert malachite.

Quelques-uns, cependant, ont modifié le procédé de ZIEHL en substituant au bleu de méthylène, d'autres colorants de contraste. C'est SPENGLER (69) qui a, pour la première fois en 1907, adopté l'acide picrique ; il ne faisait en cela qu'appliquer une remarque d'EHRlich qui avait signalé que ce produit colore avec intensité les tissus. SPENGLER décolore la préparation en la plongeant successivement dans de l'alcool saturé d'acide picrique, de l'acide nitrique à 15 %, puis de l'alcool, et l'immerge à nouveau dans l'alcool picriqué.

L'alcool picriqué de SPENGLER a été employé depuis comme colorant de contraste par C. BIOT (1) qui traite les préparations avec de l'aldéhyde formique après les avoir colorées à la fuchsine phéniquée, par TRIBONDEAU (71) et par BENDER (7), le premier décolorant par l'acide nitrique, le second par l'alcool chlorhydrique.

On est revenu aussi aux fonds bruns obtenus, non plus comme au temps de KOCH, par l'action de la vésuvine, mais par celle de l'iode préconisée par KRONBERGER (47) et PORGES (62) ou par le permanganate de potassium utilisé par WEISS (77).

Pendant la guerre, on avait en Allemagne de la peine à se procurer de l'acide nitrique et de l'alcool; pour les remplacer, KONRICH proposa l'emploi du sulfite de soude comme décolorant. Ce produit utilisé en solution aqueuse à 10 % n'altère pas les Bacilles. KONRICH colore le fond par le vert malachite. L'auteur ne publia son procédé que plus tard en 1920 (46).

SCHULTE TIGGES (66) a repris ce procédé en l'améliorant par la substitution à la solution de vert malachite de l'eau picriquée saturée.

Colorants
des bacilles
autres que
la fuchsine.

Si le colorant des Bacilles le plus courant reste la fuchsine phéniquée, les autres colorants n'ont pas été abandonnés, au contraire : pendant la guerre, certains laboratoires d'armée manquant de fuchsine ont dû y recourir et aujourd'hui, des auteurs offrent des procédés destinés à remplacer la technique de ZIEHL-NEELSEN, trop ancienne sans doute....

A l'exception de GASIS (29) qui teinte en rose par l'éosine les Bacilles tuberculeux, et après décoloration par une solution saline, le fond en bleu, et de SCHÖEDEL, qui, en 1920 propose l'emploi du bleu de méthylène phéniqué avec coloration de contraste par le brun de BISMARCK, les auteurs ont employé des colorants violets.

Le premier en date, parmi les nouveaux procédés, est celui d'HERMAN, 1889 et 1908 (37); son colorant est une solution de violet de méthyle additionnée de carbonate d'ammoniaque, ses décolorants, l'acide azotique à 10 %, puis l'alcool à 95°, tandis qu'une solution à 1 % de safranine ou d'éosine colore le fond.

LESIEUR, JACQUET et PINTENET (49), après avoir coloré par la solution de violet de gentiane phéniquée, décolorent par l'alcool additionné d'acide lactique; les Bacilles fortement colorés en violet foncé se détachent sur un fond rose obtenu par une solution de safranine.

Le violet cristal est, en solution aqueuse saturée, le colorant choisi par LUISI (52) qui ajoute quelques gouttes d'eau phéniquée à 5 % au moment de l'emploi. La décoloration qui s'obtient rapidement,

sans lavage préalable, par l'acide nitrique à 40 % est suivie d'une coloration de fond par l'orange G.

MAZZARELLI (16) enfin — 1924 — fait suivre l'action du violet de méthyle en solution aqueuse d'une décoloration par l'acide chlorhydrique et obtient avec la solution d'orange G un fond orange.

Comme UNNA (72) qui mit en évidence la structure granulée du Bacille de la lèpre par une méthode de GRAM modifiée, MUCH (56) et FONTES (25) obtiennent par des méthodes de double coloration, les granulations du Bacille tuberculeux en violet foncé et le reste du corps bacillaire en rouge.

Méthodes
de
double
coloration.

Von BETECH (8) reprend le procédé de GIBBES : son colorant est un mélange du bleu de méthylène, alcalin de LÖFFLER et de fuchsine phéniquée agissant après mordantage par l'acide azotique à 15 %. Après décoloration par l'alcool à 60°, il colore le fond par le vert malachite : les Bacilles apparaissent en rouge avec granulation en bleu foncé sur fond vert.

La substitution dans la technique de SPENGLER (69) d'un mélange de 2 parties de violet de gentiane et de 3 parties de fuchsine à la solution habituelle de ZIEHL constitue la méthode de double coloration de SPEHL (68).

En somme, les techniques proposées pour la coloration du Bacille de KOCH, quoique fort nombreuses, se rattachent à deux grands groupes suivant que le colorant du Bacille est ou n'est pas la fuchsine phéniquée. Les décolorants sont choisis en raison tantôt de l'une, tantôt de l'autre des propriétés du Bacille coloré : acido-résistance, alcool-résistance, résistance aux solutions salines.

Quant aux divers colorants de contraste, une assez grande fantaisie préside à leur choix : il importe surtout qu'ils soient tels que les Bacilles se détachent nettement sur la surface environnante.

CHAPITRE III

ACIDO-RÉSISTANCE DU BACILLE TUBERCULEUX

L'acido-résistance est une propriété essentielle aussi bien des Bacilles tuberculeux isolés de l'organisme que de ces mêmes Bacilles cultivés sur milieu électif.

Cette propriété dont on saisit l'importance dès qu'on étudie les travaux publiés sur la coloration du Bacille tuberculeux, domine en effet la plupart des techniques de coloration, ou plutôt, en demeure la base.

Quelle est la cause de l'acido-résistance du Bacille tuberculeux ? De nombreux auteurs se sont efforcés de répondre à cette question. Ils ont émis les hypothèses les plus diverses à ce sujet : les uns l'attribuent à la constitution de la membrane, les autres à celle du corps bacillaire lui-même.

Membrane

La première hypothèse émise sur les causes de l'acido-résistance avait trait à l'imperméabilité de la membrane. Depuis, on a plutôt considéré la composition chimique de celle-ci.

Imperméabilité de la Membrane

C'est EHRLICH qui, nous l'avons vu, mit le premier, occasionnellement, en évidence la résistance à l'action des acides du Bacille tuberculeux coloré.

D'après EHRLICH 1882 (21) l'acido-résistance repose sur l'imperméabilité aux acides de l'enveloppe bacillaire. Or, ZIEHL (78)

apporte la preuve que l'acide peut pénétrer à l'intérieur de ces Bacilles.

Mais EHRLICH, à la suite d'expériences nouvelles, peut affirmer que :

1° L'enveloppe bacillaire devient légèrement perméable sous l'action des mordants ;

2° Les acides minéraux forts traversent l'enveloppe bacillaire d'une façon relativement lente ;

3° La membrane sous l'action d'un acide devient complètement imperméable à des molécules complexes.

Plus tard, en 1888, UNNA (73) fait siennes les trois propositions d'EHRLICH et considère que :

1° Il se forme sans doute entre la substance bacillaire et les colorants, sous l'influence des mordants, une combinaison stable ;

2° L'addition d'acide forme une combinaison faible : [acide (colorant + substance du Bacille)] qui abandonne facilement l'acide à l'eau de lavage, tandis que le colorant reste énergiquement fixé.

Couche grasseuse extérieure

On a pensé que le Bacille est entouré d'une couche de matière grasse ou cireuse qui l'empêche aussi bien de se colorer que de se décolorer.

Cette hypothèse est émise d'abord en 1885 par SPINNA. Puis BITTER (11) en 1886, cherche les causes de l'acido-résistance dans la substance même du Bacille tuberculeux et dans les propriétés du milieu environnant pour le Bacille du smegma. Selon BITTER, une substance grasse imprègne la membrane de ces deux Bacilles.

BIENSTOCK 1886 (9) et SPINNA 1887 (70) attribuent l'acido-résistance à une substance grasseuse qui, enveloppant le Bacille tuberculeux, rend sa coloration dicicile et le protège ensuite contre la décoloration. Ces auteurs réussirent à conférer à diverses Bactéries une certaine acido-résistance.

GOTTSTEIN 1886 (34) fait, cependant, une distinction entre l'acido-résistance naturelle et l'acido-résistance artificiellement obtenue par BIENSTOCK et SPINNA ; et GRIGORJEW la même année, réfute en

partie la théorie de BIENSTOCK : en cultivant différentes Bactéries sur des milieux riches en graisses, il peut démontrer que celles qui sont directement situées dans la graisse possèdent seules l'acido-résistance.

En 1900, MARMORECK (55) observe que dans de jeunes cultures, les Bacilles ne sont pas tous acido-résistants, alors que, dans les vieilles cultures, tous les Bacilles sont acido-résistants ; il en conclut que les jeunes Bacilles n'ont pas encore leur enveloppe graisseuse.

KLEIN (1900) confirme les observations de MARMORECK, mais il en donne une autre explication (39).

Chitine

HELBING, 1901 (36) rapproche l'acido-résistance du Bacille tuberculeux de celle des œufs de *Tenia* et considère qu'elle est due à un corps voisin de la chitine et de la kératine. C'était aussi l'opinion de RUPPEL 1898 (65).

Constitution du corps bacillaire

En face des théoriciens pour qui la membrane est l'obstacle à l'action des acides sur le Bacille tuberculeux, se dressent d'autres chercheurs dont les hypothèses, appuyées sur des expériences sérieusement poursuivies, sont tout aussi vraisemblables et font, du corps bacillaire lui-même, le siège de la résistance aux acides.

Matières grasses

D'après R. KOCH 1897 (44) l'intensité de la coloration du Bacille tuberculeux et sa résistance à la décoloration sont dues aux acides gras insolubles dans l'alcool.

R. KOCH, en effet, constate que les Bacilles tuberculeux, après traitement par de la lessive de soude chaude, ont perdu complètement leur acido-résistance ; mais sa théorie ne saurait satisfaire qu'autant qu'il pourrait être prouvé que l'action de la lessive de soude chaude ne détermine pas de modification physico-chimique considérable dans la structure du Bacille. Nous restons encore devant une hypothèse.

ARONSOHN en 1898 et 1902 (3) montre que sur milieu non glycérimé, la teneur en graisse s'abaisse considérablement, tandis que l'acido-résistance persiste. Le traitement par l'alcool et l'éther ne détruit pas l'acido-résistance du Bacille. ARONSOHN en conclut qu'une petite quantité de graisse qui n'a pas été extraite suffit à déterminer l'acido-résistance.

BORREL 1904 (13) réussit à dégraisser des Bacilles : il les porte à l'ébullition dans une solution faible d'acide chlorydrique, les dessèche ensuite, puis les traite par le xylol bouillant dans un appareil à épuisement; d'autre part, il recueille et étale sur lame la substance grasse qu'il a extraite des Bacilles. Les Bacilles dégraissés ne sont plus acido-résistants, tandis que la substance grasse qu'ils ont abandonnée se colore avec intensité par le Ziehl et la coloration obtenue résiste à l'action des acides.

PREISZ, 1904, considère que la substance acido-résistante des Bacilles est une matière grasse produite par le protoplasme.

Selon CAMUS et PAGNIEZ 1905 (15) puis CIACCIO 1906 (18) l'acido-résistance est due aux acides gras seuls, car les graisses neutres ne sont pas acido-résistantes.

Structure physico-chimique spéciale

HAMMERSCHLAG 1891 (35) admet que l'acido-résistance est due à une structure physico-chimique particulière du Bacille.

Les particules d'albumine (micelles) et les particules de cellulose (molécules) sont, d'après lui, disposées d'une façon spéciale chez le Bacille tuberculeux. Cette hypothèse est peut-être la plus vraisemblable de toutes celles qui ont été émises sur la question.

FISCHER 1899 et PAPPENHEIM 1901 (60) attribuent l'acido-résistance à la présence d'un élément chimique, non défini d'ailleurs, dans le corps bactérien.

AUCLAIR et PARIS 1907 (2) sont arrivés par des traitements successifs à l'éther, l'alcool, le chloroforme et enfin l'éther de pétrole, à dégraisser complètement les Bacilles. Ces Bacilles privés de leur matière grasse conservaient encore leurs propriétés acido et alcool-résistantes.

En conséquence, AUCLAIR et PARIS estiment que : « *L'acido-*

résistance du Bacille tuberculeux n'est pas fonction des seules matières adipo-cireuses, mais appartient en propre, à des degrés variés, à toutes les parties constitutives du Bacille de Koch. »

En somme, il semble que la membrane ne soit pas la cause directe de l'acido-résistance du Bacille tuberculeux.

On ne peut définir si la matière grasse est, ou n'est pas acido-résistante.

Dans tous les cas, l'acido-résistance ne se ramène pas exclusivement aux substances grasses. La membrane plus ou moins perméable intervient indirectement, mais ce qui fixe le colorant, c'est le cytoplasme.

CHAPITRE IV

ÉTUDE COMPARATIVE DES DIFFÉRENTS PROCÉDÉS DE COLORATION

Conditions d'expérimentation — Classification

Afin de pouvoir juger de la valeur des techniques proposées en vue de la coloration des Bacilles tuberculeux dans les crachats, j'ai fait des expériences nombreuses et répétées. Je me suis attachée surtout à l'étude des techniques récentes qui ne sont, comme je l'ai démontré, que des modifications des anciennes. J'ai cherché à voir si les manipulations qu'elles nécessitent sont longues ou brèves, compliquées ou simples, et surtout si les Bacilles sont nettement colorés et faciles à rechercher.

Après avoir étalé un même crachat sur un certain nombre de lames, j'ai coloré les préparations obtenues en suivant diverses techniques, colorant toujours deux préparations de la même façon.

Essayer toutes les méthodes que j'avais à expérimenter sur un même crachat était chose impossible : j'ai répété mes expériences de nombreuses fois, de façon à connaître parfaitement les diverses techniques.

La technique habituelle de ZIEHL me servit de terme de comparaison, d'étalon ; j'ai coloré dans tous les cas deux préparations suivant cette technique et, sur un même crachat, j'ai pu connaître les méthodes qui révèlent plus, moins, ou autant de Bacilles que celle de ZIEHL. L'ensemble de mes expériences me permettant seulement, bien entendu, de tirer des conclusions sur la valeur des techniques envisagées.

La solution de fuchsine phéniquée de ZIEHL (79) modifiée par NEELSEN (58) est le colorant des Bacilles le plus généralement employé : c'est celui dont j'eus par conséquent, à me servir le plus.

J'ai donc pu, pour ainsi dire, opérer « en séries » pour le chauffage des préparations dans la liqueur de ZIEHL. Je pratique toujours le chauffage au bain-marie : les lames dont une moitié seulement est recouverte de crachat, plongent dans une cuve de porcelaine à compartiments, comme celles qui sont utilisées en histologie, et qui peut en contenir 6 différentes et même 12, si l'on met dos à dos deux préparations d'un même crachat.

La cuve de porcelaine, à demi-remplie de liqueur de ZIEHL, est placée dans un petit récipient émaillé contenant de l'eau. Je chauffe doucement sur ma platine, au bec BUNSEN et ne cesse le chauffage que lorsque les vapeurs s'échappent du bain colorant : je ne commence pas la décoloration avant 3 minutes écoulées.

Pour colorer les préparations suivant les techniques qui n'utilisent pas la fuchsine, j'ai chauffé les lames recouvertes de colorant, doucement sur ma platine chauffante avec la veilleuse du bec BUNSEN. Les solutions colorantes en effet varient avec chaque technique : bleu de méthylène alcalin de KOCH (42), bleu de méthylène phéniqué de SCHÆDEL, violet aniliné d'EHRlich (21), violet cristal alcalin de HERMANN (37), violet de gentiane phéniquée de LESIEUR (49), violet cristal en simple solution aqueuse de LUISI (52), violet de méthyle de MAZZARELLI (16), éosine de GASIS (29).

Je pratique la décoloration suivant les indications des auteurs en ayant soin toujours, pour être sûre que les Bacilles restent intensément colorés, d'arrêter l'action de l'agent décolorant quand l'ensemble de la préparation est encore légèrement teinté.

Après avoir, à l'eau courante, lavé parfaitement la préparation, je fais agir le colorant de contraste, lave à nouveau, puis sèche la lame au papier. Elle est prête alors pour l'examen microscopique que je pratique à l'immersion avec un microscope NACHER, objectif $\frac{1}{12}$, oculaire 2.

Pour exposer ici les divers procédés de coloration, j'ai donc considéré qu'ils forment deux grands groupes distincts :

a) Techniques de coloration du Bacille tuberculeux par la fuchsine phéniquée ;

b) Techniques utilisant d'autres colorants que la fuchsine.

Ces dernières sont classées suivant le colorant employé. J'ai négligé, tout en les ayant essayées, de faire une place ici, parce qu'elles ne présentent pas d'intérêt pratique, aux méthodes de double coloration qui mettent en évidence les granulations chromatophiles du Bacille de Koch.

En même temps que leurs procédés de concentration, des auteurs donnent leurs techniques et des directives pour la coloration du résidu obtenu, certains indiquent, avec des procédés spéciaux de fixation, un décolorant autre que l'acide nitrique de ZIEHL, d'autres enfin varient le colorant de contraste. Je n'indique ces modifications que dans la deuxième partie de ce travail, avec la technique de concentration dont elles ne sont qu'un accessoire.

CHAPITRE V

TECHNIQUES UTILISANT LA FUCHSINE PHÉNIQUEE

Le colorant du Bacille de Koch qui est encore aujourd'hui le plus employé dans la pratique courante est la liqueur de ZIEHL (79) modifiée par NEELSEN (58).

PRÉPARATION DE LA LIQUEUR DE ZIEHL-NEELSEN

La formule de la liqueur de ZIEHL-NEELSEN est la suivante :

Fuchsine basique	1 gr.
Phénol cristallisé	5 gr.
Alcool à 95°.....	10 cm ³ .
Eau distillée	100 cm ³ .

Triturer dans un mortier le phénol et la fuchsine (fuchsine R. A. L.). Quand le mélange est parfait, ajouter doucement en remuant 10 centimètres cubes d'alcool à 95°, puis, par petites portions, en continuant de remuer, 60 centimètres cubes d'eau distillée. Verser dans un flacon, rincer le mortier avec 40 centimètres cubes d'eau distillée, les ajouter au colorant déjà versé dans le flacon ; laisser reposer 24 heures et filtrer.

La solution de fuchsine phéniquée préparée ainsi est stable ; obtenue par simple mélange d'une solution alcoolique de fuchsine et d'eau phéniquée à 5 %, elle ne le serait pas.

Cette solution colore intensément à chaud la préparation en rouge. Après action d'un agent décolorant, qu'il soit acide, alcoolique ou alcalin, les Bacilles tuberculeux seuls, restent colorés en rouge. On colore généralement le fond légèrement, à froid, de façon différente.

TECHNIQUES DE COLORATION DU BACILLE TUBERCULEUX PAR LA FUCHSINE PHÉNIQUÉE

I. — TECHNIQUES UTILISANT DES DÉCOLORANTS ACIDES

A. Colorant de contraste : Bleu de méthylène.

Les éléments cellulaires : leucocytes, cellules épithéliales de la bouche ; les Levures, les germes divers, colorés en bleu font contraste avec les Bacilles rouges.

*Technique dite de Ziehl-Neelsen*¹.

Les préparations fixées sont colorées à chaud au bain-marie par la liqueur de Ziehl jusqu'à dégagement de vapeurs. Je cesse alors le chauffage mais attends 3 minutes avant de décolorer.

Les préparations lavées sous un courant d'eau qui enlève l'excès de colorant doivent être immergées dans de l'acide nitrique dilué à un tiers, une minute au plus. Je plonge très rapidement chaque préparation dans la solution d'acide nitrique, lave à grande eau et recommence ainsi deux ou trois fois. La décoloration est achevée par de l'alcool à 95°, jusqu'à ce que la préparation ne soit plus que très légèrement rose.

Le fond peut être coloré par n'importe quel colorant bleu : j'emploie la solution de bleu boracique de SAHLI dont la formule est la suivante :

Eau bouillante	100 cm ³ .
Borate de soude	5 gr.
Bleu de méthylène pur	2 gr.

Pour l'emploi, cette solution est diluée à 1/50 par de l'eau distillée, les préparations sont immergées au plus une demi-minute dans la solution obtenue.

¹ On pourrait la nommer plus justement : technique de KOCH-EHRlich-ZIEHL modifiée par NEELSEN.

*Modification de la technique dite de Ziehl-Neelsen*¹

Après coloration par la fuchsine phéniquée et lavage à l'eau, immerger 20 secondes la préparation dans une solution d'acide sulfurique à 1/5, puis passer à l'alcool à 60° et recolorer.

Colorer le fond par la solution de SAHLI.

*Autre modification de la technique dite de Ziehl-Neelsen*²

On opère comme précédemment, mais le décolorant est une solution d'acide acétique à 1/3 dans l'alcool à 95°, agissant 20 secondes.

Technique de Weichselbaum, 1883

La technique suivie est jusqu'à la coloration de contraste exclusivement celle de ZIEHL-NEELSEN. On recolore par une solution alcoolique saturée de bleu de méthylène.

Technique de Bayard, 1918 (6)

La technique de BAYARD est essentiellement caractérisée par l'emploi du réactif glycéro-boriqué.

L'acide borique est un acide extrêmement faible en solution aqueuse, mais sa force est exaltée en solution alcoolique ; elle l'est plus encore si l'on associe de la glycérine à la solution alcoolique saturée d'acide borique. Le mélange de quatre parties de solution d'acide borique à saturation et d'une partie de glycérine constitue le décolorant de BAYARD dont l'action est cependant faible.

L'auteur conseille de fixer la préparation par le mélange :

Alcool méthylique pur	75 gr.
Acétone	25 gr.
Acide acétique	XX gouttes.

ou par :

Alcool-éther P. E.	100 cm ³ .
Acide acétique	X gouttes.

¹ D'après Professeur CALMETTE : *L'Infection bacillaire et la Tuberculose*, 1922, p. 15.

² D'après Professeur CALMETTE : *L'Infection bacillaire et la Tuberculose*, 1922, p. 15.

Colorée par la fuchsine phéniquée à chaud, comme je l'ai indiqué plus haut à propos de la technique dite de ZIEHL-NEELSEN, la préparation est, sans lavage préalable, recouverte de réactif glycéroboriqué qui est rejeté dès qu'il est coloré en rouge, et remplacé plusieurs fois jusqu'à ce qu'il reste incolore.

Alors, on lave à l'eau courante pour éliminer toute trace de glycérine, puis, après l'avoir fait sécher, on recolore la préparation par une solution de bleu de méthylène. J'emploie ici encore, dans les mêmes conditions que précédemment, la solution de bleu boracique de SAHLI.

Cette technique est assez longue, il faut de 5 à 10 minutes pour que la décoloration soit suffisante.

B. Colorant de contraste : acide picrique.

Les colorants bleus, le bleu de méthylène surtout, furent longtemps seuls employés à la contre-coloration des préparations dans lesquelles les Bacilles tuberculeux sont colorés en rouge par la fuchsine phéniquée. Mais, l'acide picrique fut proposé en 1907 comme colorant de contraste par K. SPENGLER.

A l'aide des techniques utilisant l'acide picrique comme colorant de contraste, les Bacilles se détachent en rouge sur un fond uniformément jaune ; les éléments cellulaires se devinent à peine, les autres germes n'apparaissent pas.

Technique de Karl Spengler, 1907 (69)

K. SPENGLER a utilisé l'acide picrique en solution alcoolique, Après avoir été colorées par la liqueur de ZIEHL et lavées, les préparations sont immergées une minute dans l'alcool picriqué :

Solution saturée aqueuse d'acide picrique	60 cm ³ .
Alcool absolu	40 cm ³ .

Elles sont ensuite lavées dans l'alcool à 60°, décolorées par l'acide nitrique à 15 %, 20 secondes, puis par l'alcool à 60°, aussi longtemps qu'il est nécessaire pour qu'il ne reste plus trace de couleur. Enfin, elles sont plongées à nouveau dans l'alcool picriqué.

Un nouveau lavage à l'eau courante est alors nécessaire pour éviter, sur la préparation, la formation de cristaux d'acide picrique.

Technique de K. Spengler, modifiée par Tribondeau, 1917 (71)

La technique suivie par TRIBONDEAU est plus simple que celle de SPENGLER : elle est, en effet, analogue à celle de ZIEHL : on décolore les préparations par l'acide nitrique à 1/3, puis l'alcool à 95° ; mais les préparations sont recolorées par l'alcool picriqué de SPENGLER pendant trois minutes.

Technique de Bender, 1921 (7)

La technique de BENDER diffère de la technique classique de ZIEHL, à la fois par le décolorant qui est l'alcool chlorhydrique à 3 % que l'on fait agir deux minutes, et par le colorant de contraste qui est l'alcool picriqué de SPENGLER.

C. Fond brun.

Des techniques assez récentes proposent d'observer les Bacilles tuberculeux colorés en rouge par la fuchsine phéniquée sur fond brun. Elles n'emploient pas pour la contre-coloration la vésuvine qu'avait employée KOCH, mais des agents oxydants : le permanganate de potassium, l'iode.

Technique de Weiss, 1919 (77)

Dans la méthode de WEISS, le colorant de contraste substitué au bleu de la technique de ZIEHL-NEELSEN est une solution de permanganate de potassium à 0 gr. 10 %. Il faut laisser la préparation au moins vingt minutes dans la solution pour que le fond présente une légère teinte brune.

Technique de Kronberger, 1910 (47).

KRONBERGER emploie à la contre coloration des préparations, l'iode en solution alcoolique.

Le colorant de contraste est le mélange suivant :

Teinture d'iode 15 %	1 partie.
Alcool à 95°	4 parties.

dont l'action est brutale : aussi la préparation doit être plongée très rapidement dans le colorant, retirée aussitôt et lavée longuement.

Technique de Porges, 1916 (62)

Comme KRONBERGER, PORGES recolore en brun les préparations par l'iode ; mais il ajoute de l'acide chlorhydrique à une solution alcoolique d'iode.

Il faut, comme précédemment, faire agir très peu de temps le colorant :

Teinture d'iode 10 %	92 parties.
Acide chlorhydrique	8 parties.

II. — TECHNIQUES UTILISANT DES DÉCOLORANTS ALCALINS

A. Colorant de contraste : bleu de méthylène.

Technique de Müller, 1901 (57)

Après action de la fuchsine phéniquée sur les préparations de crachats, MULLER emploie comme décolorant des solutions alcalines, notamment :

a) Une solution de bicarbonate de soude à 10 % dans l'alcool à 70°. Laisser agir, d'après l'auteur, 15 minutes. Je n'ai jamais pu obtenir de décoloration suffisante, en moins d'une demi-heure ;

b) De l'eau oxygénée, 12 volumes, alcalinisée par la soude agissant 5 minutes. Ici encore le temps de décoloration indiqué est insuffisant : il faut laisser agir le décolorant de 15 à 20 minutes.

Dans l'un et l'autre cas, le fond est coloré par une solution de bleu de méthylène. J'emploie comme toujours la solution de SAHLI.

B. Colorant de contraste : acide picrique.

Technique de Schulte-Tigges, 1920 (66)

SCHULTE-TIGGES utilise comme décolorant une solution de sulfite de soude, et comme colorant de contraste l'acide picrique en solution aqueuse saturée.

« Colorer les préparations par une solution de fuchsine phéniquée obtenue en mélangeant à 90 centimètres cubes d'une solution à 5 % d'acide phénique, 10 centimètres cubes d'une solution saturée de fuchsine dans l'alcool à 95°. A partir du dégagement de vapeurs, chauffer la préparation au moins une minute encore. Puis décolorer dans une solution aqueuse à 10 % de sulfite de soude desséché. Après lavage à l'eau distillée, colorer le fond par l'eau picrique saturée, puis laver à l'eau courante. »

Telle est la technique proposée par SCHULTE-TIGGES ; je me suis aperçue de l'insuffisance de la coloration obtenue par la solution de fuchsine de l'auteur et j'ai, depuis, toujours utilisé la liqueur de ZIEHL avec le procédé de chauffage au bain-marie indiqué antérieurement.

La solution de sulfite de soude doit être renouvelée au moins une fois par semaine : elle perd en effet rapidement son pouvoir décolorant par suite de la transformation du sulfite en sulfate. L'action en est toujours lente : quand la solution est récente, une décoloration suffisante des préparations n'est obtenue qu'au bout de 5 minutes au moins de contact.

La solution de sulfite de soude ne risque pas de décolorer les Bacilles tuberculeux. En effet, si on la laisse agir longtemps, même 24 heures, sur les préparations, les Bacilles tuberculeux sont encore très bien colorés.

La coloration de contraste est obtenue par un séjour de deux minutes dans la solution saturée d'acide picrique, le bain colorant doit être remplacé assez souvent, car il colore plus difficilement au bout de quelques jours.

La préparation colorée a une teinte jaune orange ; au microscope les Bacilles apparaissent rouges sur un fond entièrement jaune, dans lequel les éléments cellulaires se devinent à peine, tandis que les germes étrangers sont invisibles. On voit, en dehors des Bacilles tuberculeux tels que les révèle la technique de ZIEHL-NEELSEN, de tout petits Bacilles ou des fragments de Bacilles colorés en rouge.

Les lavages à l'eau distillée semblent compliquer cette technique. J'ai obtenu de tout aussi bons résultats, en effectuant tous les

lavages prescrits avec l'eau de la Loire dont voici, d'après une analyse récente ¹ la composition chimique :

Oxygène dissous	{ en volume	5 cm ³ 65.
	{ en poids	8 millig. 125.
Matières organiques		3 — 024.
Ammoniaque		0 — 416.
Nitrites		0 — 00.
Nitrates		13 —
Chlorure de sodium		20 —
Résidu salin		200 —
Titre hydrotimétrique	{ total	14°.
	{ permanent	17°.
Teinture de savon		Rien.
Ebullition		Pas de dépôt.

C. Colorant de contraste : vert malachite.

Technique de Konrich, 1920 (46)

Ce procédé est antérieur à celui de SCHULTE-TIGGES.

Après avoir coloré la préparation par la fuchsine à chaud, on la décolore dix minutes par la solution de sulfite de soude à 10 %. Puis on colore une demi-minute par une solution de vert malachite (50 parties de solution aqueuse saturée pour 100 parties d'eau distillée).

Cette technique ne donne pas d'aussi bons résultats que celle de SCHULTE-TIGGES, car le fond vert est défavorable à l'observation.

III. — TECHNIQUES COMPORTANT UN RENFORCEMENT DE LA COULEUR DES BACILLES

Technique de Kühne, 1888-90 (48), modifiée par Borrel 1893 (12)

On colore la préparation par le Ziehl phéniqué à chaud, puis on la traite quelques secondes par une solution de chlorhydrate d'aniline à 2 % dans l'eau distillée.

Puis, on la décolore par l'alcool absolu. Le fond est teinté par une

¹ Je dois ces résultats à l'obligeance de M. le Professeur GAUDIN, chef du Laboratoire de l'Ecole de Médecine.

solution de bleu de méthylène. Le chlorhydrate d'aniline ne décolore pas.

Les Bacilles tuberculeux ne sont pas plus intensément colorés que par la technique habituelle de ZIEHL ; mais les éléments histologiques qui les accompagnent dans les crachats sont toujours respectés et restent même, le plus souvent, légèrement teintés en rose. Il s'ensuit que la technique de KUHNE-BORREL, peu employée pour la recherche du Bacille tuberculeux dans les crachats, est celle à laquelle on a le plus souvent recours quand il s'agit de coupes, et j'ai eu, dans ce cas, l'occasion de la suivre.

Technique de C. Biot, 1913 (1).

BIOT utilise, pour aviver la couleur des Bacilles tuberculeux colorés par la fuchsine phéniquée, un produit beaucoup plus courant que le chlorhydrate d'aniline : la solution de formol à 40 %, dans laquelle on laisse la préparation 5 minutes, après coloration par la fuchsine phéniquée, et avant l'action de l'acide nitrique.

La décoloration par l'acide nitrique à 1/3 se pratique exactement suivant la technique de ZIEHL-NEELSEN. L'alcool picriqué de SPENGLER colore en jaune le fond sur lequel les Bacilles apparaissent colorés en rouge très foncé, presque noirs.

IV. — TECHNIQUES UNISSANT LA DÉCOLORATION ET LA COLORATION
DE CONTRASTE

Technique de Rondelli et Buscaroni, 1897 (64).

RONDELLI et BUSCARONI traitent les préparations par une solution d'hypochlorite qui, ayant une action oxydante, colore le fond en brun.

On fait suivre la coloration à chaud par la liqueur de ZIEHL d'un traitement par une solution d'hypochlorite préparée extemporanément avec les deux solutions suivantes :

1° Chlorure de chaux	6 gr.
Eau distillée	60 cm ³

2° Carbonate de potasse	12 gr.
Eau distillée	40 cm ³

filtrées séparément et mélangées au moment de l'emploi.

L'action de cet oxydant est très violente, aussi faut-il y plonger la préparation rapidement et la retirer aussitôt, puis la laver à l'eau courante pour la débarrasser de la mousse qui la recouvre.

L'hypochlorite, oxydant énergique, colore en brun la préparation, rendant inutile l'action d'un colorant de contraste. Les Bacilles tuberculeux se détachent mal dans les préparations traitées par cette méthode.

Technique de Fraenkel, 1884 (26), modifiée par Gabbet, 1887 (28).

La décoloration des préparations colorées par la fuchsine phéniquée et leur recoloration sont réalisées, simultanément, dans la technique de FRAENKEL-GABBET, par une solution acide de bleu de méthylène.

La coloration comprend deux temps :

1° Coloration par la fuchsine phéniquée à chaud jusqu'à émission de vapeurs ;

2° Décoloration et recoloration par la solution de bleu de méthylène acide.

Cette solution de formule :

Bleu de méthylène.....	en excès.
Acide sulfurique.....	25 gr.
Eau distillée	100 gr.
Alcool à 95°.....	50 gr.

est laissée 2 minutes sur le frottis de crachats ; puis on lave à l'eau courante.

Ce procédé est plus rapide que celui de ZIEHL. Les préparations présentent le même aspect que lorsqu'on suit la technique de ZIEHL : les Bacilles tuberculeux sont rouges sur fond bleu.

Technique de Cépède, 1918 (17).

Le principe est le même que celui de la technique de FRAENKEL-GABBET. A quatre parties d'alcool absolu, ajouter une partie de la solution suivante :

Bleu de méthylène.....	en excès
Acide lactique pur.....	20 cm ³
Eau distillée	80 cm ³

pour obtenir le « *lacto-bleu de Cépède* ».

Les préparations colorées par la fuchsine phéniquée sont lavées. Puis, après lavage, elles sont recouvertes de quelques gouttes de « *lacto-bleu* », qu'on laisse 5 minutes en contact, dit l'auteur. Mais j'ai toujours constaté qu'il suffit de 2 minutes de contact pour obtenir la décoloration du fond et sa recoloration en bleu.

Technique de Cépède, modifiée par Sollier et Davidovitch,
1924 (67).

SOLLIER et DAVIDOVITCH recommandent l'emploi du « *lacto-vert* ». Les auteurs remplacent le bleu de méthylène par le vert malachite.

Comme les techniques précédentes, celle-ci est simple, rapide, mais je trouve que la recherche des Bacilles tuberculeux se fait plus facilement sur fond bleu que sur fond vert. Le bleu fatigue moins la vue que le vert.

CHAPITRE VI

TECHNIQUES UTILISANT D'AUTRES COLORANTS QUE LA FUCHSINE

I. — BLEU DE MÉTHYLÈNE

*Technique de Koch, 1882 (42). — Coloration de contraste
par déplacement*

La technique primitive de Koch est abandonnée depuis fort longtemps ; KOCH lui-même se rallia plus tard au procédé d'EHRlich. La technique de KOCH est intéressante au point de vue historique, puisqu'elle permet au grand savant allemand de découvrir le Bacille de la Tuberculose dans les produits caséeux ; mais elle ne peut être employée dans la pratique courante, puisqu'elle ne permet pas de différencier le Bacille de KOCH des autres Bacilles.

Les préparations sont colorées 24 heures à froid, dans la solution suivante :

Solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène	1 cm ³
Eau distillée	200 cm ³
Solution à 10 % de potasse.....	0 cm ³ 20

Après lavage à l'eau distillée, contre-coloration par une solution concentrée de vésuvine. La vésuvine remplace le bleu de méthylène là où il n'est pas intensément fixé. Les Bacilles seuls restent colorés en bleu, tandis que les cellules se colorent en brun.

Les Bacilles sont donc bleus sur fond brun.

Cette technique ne m'a pas donné de bons résultats, cela tient peut-être à ce que je n'ai pas une pratique suffisante du déplacement d'un colorant par un autre colorant.

Technique de Schœdel, 1920. Décolorant acide.

Dans les préparations colorées selon cette technique, les Bacilles tuberculeux sont, comme lorsqu'on suit la technique de KOCH, colorés en bleu sur fond brun.

Le colorant de SCHŒDEL est le suivant :

Solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène	1 partie.
Eau phéniquée 2 %.....	9 parties.

que l'on fait agir à chaud sur les frottis de crachats, décolorés ensuite en 2 minutes par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 3 %, puis recolorés par le brun de BISMARCK.

Je n'ai jamais obtenu de bons résultats avec cette technique. De plus, la solution colorante, toujours fluide aussitôt après sa préparation, devient rapidement pâteuse, inutilisable.

II. — COLORANTS VIOLETS

Technique d'Ehrlich, 1882 (21).

EHRLICH a conseillé de colorer le Bacille de Koch soit par le violet de méthyle aniliné, soit par la fuchsine anilinée.

J'ai suivi sa technique primitive utilisant le violet de méthyle aniliné. EHRLICH versait goutte à goutte l'eau anilinée saturée dans une solution alcoolique saturée de violet de méthyle, jusqu'à ce qu'il se produise à la surface du liquide des ondes moirées à reflets métalliques persistants.

WEIGERT (76) a précisé les doses à employer :

Eau anilinée	100 cm ³ .
Solution saturée de violet dans l'alcool absolu	11 cm ³ .

On fait agir cette solution 24 heures à froid sur les préparations, puis on décolore par de l'acide nitrique à 1/3 et on lave.

Les Bacilles sont colorés en violet foncé, tandis que les éléments cellulaires sont grisâtres.

Technique d'Herman (de Mons), 1889 et 1908 (37).

Le colorant d'HERMAN est une solution alcaline de violet cristallisé.

On colore à chaud, pendant une minute, les préparations par un mélange d'une partie de solution à 3 % de violet cristallisé dans l'alcool absolu et de trois parties de solution à 1 % de carbonate d'ammoniaque dans l'eau distillée.

On décolore, pendant quelques secondes, par l'acide azotique à 10 %, puis par l'alcool à 95°, jusqu'à ce que l'ensemble de la préparation présente une teinte bleu pâle. Puis on lave la préparation à l'eau distillée. Enfin, on recolore par une solution aqueuse d'éosine à 1 % ou de safranine à 1 %.

Les Bacilles sont colorés en bleu intense sur fond rose ; les préparations sont très claires et très jolies.

Technique de Lesieur, Jacquet et Pintenet, 1919 (49)

Le colorant employé par ces auteurs est la solution de violet de gentiane utilisée habituellement pour la méthode de GRAM et préparée ainsi : « Triturer ensemble 1 gr. de violet de gentiane et 5 gr. d'acide phénique ; ajouter peu à peu en remuant 10 cm³ d'alcool absolu, puis 40 cm³ d'eau distillée ; verser dans un flacon, rincer le mortier avec de l'eau distillée et ajouter cette eau à la solution qui est dans le flacon ; compléter à 100 cm³ avec de l'eau distillée, filtrer. »

Les préparations fixées sont colorées à chaud pendant trois minutes jusqu'à émission de vapeurs, décolorées par de l'alcool fort contenant, en poids, 3 % d'acide lactique, pendant cinq minutes, puis recolores par une solution aqueuse de safranine à 1/500. Sur un fond rose, les Bacilles se détachent colorés en violet foncé.

Technique de Luisi, 1922 (52).

Le colorant de LUISI est le violet cristal en solution phéniquée.

A 10 cm³ d'une solution aqueuse saturée de violet cristal, ajouter au moment de l'emploi, deux à trois gouttes de solution de phénol à 5 %.

Colorer les préparations à chaud par cette solution phéniquée. Ne pas les laver. Décolorer rapidement par l'acide nitrique à 40 %. Colorer le fond par une solution aqueuse saturée d'orange G. Les Bacilles sont colorés en violet sur fond orange.

Technique de Mazzarelli, 1924 (16).

Bien que MAZZARELLI emploie à la coloration des Bacilles tuberculeux un violet et, à la contre-coloration, la même solution d'orange G, sa technique est très différente de celle de LUISI.

En effet, Mazzarelli utilise une solution aqueuse de violet de méthyle et non pas une solution phéniquée de violet cristal ; de même, le décolorant n'est pas l'acide nitrique, mais l'acide chlorhydrique.

On colore les préparations par une solution à 1 % de violet de méthyle dans l'eau distillée, à chaud, pendant deux minutes. On décolore par l'acide chlorhydrique à 1/3 en deux ou trois secondes au plus. Après un nouveau lavage, on recolore, pendant une demi-minute, par la solution saturée d'orange G.

III. — EOSINE

Technique de Gasis, 1909 (29).

La technique de GASIS nécessite trois solutions :

1° Le colorant.

Faire à froid la solution :

Eosine cristallisée	1 gr.
Alcool absolu	5 cm ³ .
Eau distillée	95 cm ³ .

puis, après lui avoir ajouté 0 gr. 30 de bichlorure de mercure, la porter à l'ébullition dans une fiole conique jusqu'à dissolution complète du sublimé. Après refroidissement, décantier la solution dans laquelle s'est formé un précipité.

2° Le décolorant :

Soude caustique	0 gr. 50.
Iodure de potassium	1 gr.
Alcool à 50°	100 cm ³ .

3° Le colorant de contraste :

Bleu de méthylène cristallisé.....	1 gr.
Alcool absolu	10 cm ³ .
Acide chlorhydrique	0 cm ³ 5.
Eau distillée	90 cm ³ .

Colorer à chaud avec la solution 1 jusqu'à émission de vapeurs durant deux minutes. Laver à l'eau, puis faire agir la solution 2 jusqu'à ce qu'une coloration verdâtre remplace la couleur rouge. Laver à l'alcool à 95°, puis à l'eau et faire agir trois secondes la solution 3.

Les Bacilles sont colorés en rose très pâle et difficilement visibles sur le fond bleu.

CHAPITRE VII

CRITIQUE DES TECHNIQUES DE COLORATION

Mes recherches en vue d'une étude comparative des diverses méthodes de coloration m'ont fait constater une différence très grande entre les résultats que donnent les procédés dérivés de celui de ZIEHL et utilisant sa solution et ceux qui ont recours à d'autres colorants.

Certes, les techniques de KOCH, d'EHRlich donnent des préparations inconstantes et où il est souvent difficile de percevoir les Bacilles. Mais les techniques plus modernes, celles qu'on nous propose de substituer à la technique de ZIEHL, ne m'ont pas donné des résultats sensiblement meilleurs que celle de ZIEHL.

Avec la technique de SCHÖDEL, les Bacilles se détachent mal du fond de la préparation.

Avec les méthodes d'HERMAN, LESIEUR, LUISI, MAZZARELLI, les préparations de crachats sont rapidement colorées, elles sont nettes, claires et même jolies ; mais le nombre des Bacilles mis en évidence, même avec la méthode de MAZZARELLI, la moins imparfaite cependant, y est moins grand que sur les plaques préparées d'après les indications de ZIEHL.

Quant à la technique de GASIS, de manipulation longue et compliquée, si elle donne des préparations aux couleurs attrayantes, ce n'est guère qu'un fond agréable sur lequel les Bacilles sont difficilement visibles.

Je suis donc obligée de m'inscrire en faux contre l'opinion de LORION (51) qui considère les techniques de SCHÖDEL et LUISI comme aussi rigoureuses que celle de ZIEHL-NEELSEN et, à plus forte

raison, contre ELISABETH KONGSTED (45) pour qui le procédé d'HERMAN est supérieur à celui de ZIEHL.

J'affirme encore la supériorité des procédés qui utilisent comme colorant la solution phéniquée de fuchsine. Les résultats de chaque procédé ne sont pas, toutefois, égaux ou équivalents, quelques-uns, mais ils sont rares, sont même loin d'être bons. En suivant les indications de RONDELLI, KRONBERGER et PORGES, on n'a que des préparations où il est difficile de percevoir les Bacilles ; avec les techniques de KÜHNE, MULLER, WEICHELBAUM, BAYARD et les méthodes de décoloration par des acides autres que l'acide nitrique, on obtient de bons résultats, mais ces résultats ne sont pas supérieurs à ceux obtenus avec la technique de ZIEHL-NEELSEN. La technique de FRAENKEL-GABBET, décoloration et coloration diffuses simultanées, permet d'obtenir rapidement de bonnes préparations sur lesquelles les Bacilles se révèlent souvent plus nombreux que par la technique de ZIEHL-NEELSEN, tandis qu'ils se montrent moins nombreux et moins apparents avec les procédés de CÉPÈDE, de SOLIER et DAVIDOVITCH.

La diversité des résultats obtenus n'est pas imputable seulement au mode de décoloration : la teinte du fond qui peut sembler n'être qu'accessoire est, à la vérité, très importante. On a toujours des résultats meilleurs si le fond est bleu que s'il est vert, meilleurs encore s'il est jaune ou très légèrement brun. La supériorité de toutes les méthodes dont le colorant de fond est l'acide picrique en solution aqueuse ou en solution alcoolique est certaine : telles sont celles de SPLENGER, TRIBONDEAU, BENDER, BIOT, SCHULTE-TIGGES. Ces deux dernières, aux avantages du fond jaune, en ajoutent d'autres : celle-ci, décoloration par le sulfite de soude qui, même en agissant longtemps, ne risque pas d'attaquer les Bacilles, celle-là, netteté parfaite des Bacilles très colorés grâce à l'action du formol.

J'ai étudié plus particulièrement les techniques de SPLENGER modifiée par TRIBONDEAU, de BIOT, de SCHULTE-TIGGES en les comparant à celle de ZIEHL-NEELSEN.

CHAPITRE VIII

COMPARAISON DE QUELQUES TECHNIQUES RÉCENTES AVEC LA TECHNIQUE DE ZIEHL

Après avoir expérimenté, comme je viens de l'exposer, diverses techniques de coloration du Bacille tuberculeux, j'ai étudié plus particulièrement, en faisant des comparaisons numériques, la technique classique de ZIEHL et les techniques plus récentes de BIOT, SPENGLER-TRIBONDEAU et SCHULTE-TIGGES.

Pour arriver à des comparaisons rigoureusement précises entre les diverses techniques, il faudrait pouvoir comparer entre eux les nombres de Bacilles contenus dans des quantités égales de mêmes crachats préalablement homogénéisés mécaniquement pour assurer la répartition régulière des Bacilles ; mais une rigoureuse précision est impossible, car la quantité étalée sur une lame est trop faible et la surface réelle d'un champ de l'objectif est infime.

Sans envisager le volume de crachat étalé, on s'en tient habituellement à la numération des Bacilles d'un certain nombre de champs successifs, une vingtaine par exemple pour une même préparation, et l'on prend comme terme de comparaison le chiffre moyen des Bacilles trouvés dans chaque préparation.

On oublie ainsi que l'étalement peut n'être pas régulier, que les Bacilles peuvent être massés en un même point de la préparation, plus rares ou même absents en d'autres points.

De plus, dans l'examen de tout un champ de l'objectif, on compte sans guide, sans point de repère, des germes parsemés irrégulièrement dont un certain nombre peuvent être omis, alors que d'autres sont comptés deux fois.

Pour écarter au moins cette cause d'erreur, chaque fois que j'ai opéré des numérations, soit en vue d'étudier les méthodes de coloration, soit pour rechercher l'enrichissement fourni par les méthodes de concentration, j'ai fait usage d'un réseau oculaire de R. BAZIN et je n'ai pas établi le nombre moyen des Bacilles par champ. Ce réseau étant composé de petits carrés, l'observation a porté, dans chaque champ, sur un ensemble de 25 petits carrés. En déplaçant la platine mobile du microscope, j'ai présenté à l'objectif 20 champs d'une même préparation pris en des points divers de la même lame. Après avoir compté pour chaque préparation les Bacilles contenus dans 500 divisions, il suffisait, pour comparer entre elles deux méthodes, de comparer les nombres de Bacilles trouvés, avec chacune de ces méthodes, dans 500 petits carrés du réseau oculaire.

Pour augmenter la précision de mes expériences, j'avais à essayer les diverses techniques de coloration sur le même frottis de crachats; il fallait donc colorer successivement une même préparation :

- 1° par la technique classique de ZIEHL ;
- 2° par la technique de SPENGLER modifiée par TRIBONDEAU ;
- 3° par la technique de SCHULTE-TIGGES ;
- 4° par la technique de BIOT.

Puis, en prévision de différences éventuellement constatées, afin d'en reconnaître les causes, il était nécessaire de faire de nouvelles numérations :

1° Essayer successivement sur une même préparation l'action décolorante.

- a) de l'acide nitrique à 1/3 (technique de ZIEHL) ;
- b) de l'acide nitrique à 1/3 avec traitement préalable au formol (technique de BIOT).
- c) du sulfite de soude à 10 % (technique de SCHULTE-TIGGES)

en ne procédant dans aucun cas à la contre-coloration.

2° Comparer l'influence des colorants de contraste en employant successivement sur une même préparation colorée par la fuchsine de ZIEHL :

- a) le bleu de méthylène aqueux ;
- b) le bleu de méthylène alcoolique ;
- c) le vert malachite ;
- d) l'alcool picriqué ;
- e) l'eau picriquée.

Les trois colorants de contraste employés dans les techniques qui nous intéressent ici, sont le bleu de méthylène aqueux (ZIEHL), l'alcool picriqué (SPENGLER-TRIBONDEAU), l'eau picriquée (SCHULTE-TIGGES).

Il s'agissait de voir si la substitution du bleu de méthylène alcoolique (WEICHSELBAUM) au bleu de méthylène aqueux (ZIEHL) pour la coloration diffuse peut faire varier le nombre des Bacilles mis en évidence.

De constater également si le nombre des Bacilles, après décoloration de la préparation par le sulfite de soude à 10 %, est plus grand lorsque la contre-coloration est faite par l'eau picriquée saturée (SCHULTE-TIGGES), que par le vert malachite (KONRICH).

Pour de tels examens, les manipulations assez longues devaient comporter :

- 1° Application soignée d'une technique, les temps de coloration et de décoloration étant évalués à x'' près ;
- 2° Examen microscopique au réseau oculaire ;
- 3° S'il s'agit d'étudier l'action des décolorants : décoloration complète de la préparation et des Bacilles tuberculeux eux-mêmes.

S'il s'agit uniquement d'étudier l'influence des colorations de contraste : élimination du seul colorant diffus.

La même série de manipulations devait être appliquée à chaque technique.

J'ai employé, pour la décoloration complète des préparations, l'alcool à 95° contenant 1 % d'acide chlorhydrique.

Mais cette décoloration ne risquait-elle pas d'altérer les Bacilles, de les rendre moins aptes à se recolorer, ce qui eût conduit à des résultats erronés ?

J'ai fait les essais suivants : d'une part, en appliquant plusieurs fois à une même préparation la décoloration par l'acide nitrique ;

d'autre part, en appliquant plusieurs fois à une même préparation la décoloration par le sulfite de soude.

Voici les résultats que j'ai obtenus :

Décoloration par l'acide nitrique.

Nombre des Bacilles dans 500 carrés du réseau oculaire

Préparation A. — 1 ^{re} coloration...	50 Bacilles
2 ^e coloration...	25 Bacilles
3 ^e coloration...	12 Bacilles

Préparation B. — 1 ^{re} coloration...	42 Bacilles
2 ^e coloration...	29 Bacilles
3 ^e coloration...	18 Bacilles

Décoloration par le sulfite de soude.

1 ^{re} coloration...	45 Bacilles
2 ^e coloration...	24 Bacilles
3 ^e coloration...	16 Bacilles

Ces nombres prouvent suffisamment que la décoloration complète altère la colorabilité des Bacilles, j'ai dû renoncer à opérer comme je voulais le faire pour comparer l'action décolorante de l'acide nitrique et du sulfite de soude.

D'autre part, on ne peut être sûr, en voulant éliminer seulement le colorant de contraste, de ne pas altérer les Bacilles eux-mêmes, surtout, quand la contre-coloration est faite avec de l'acide picrique. J'ai comparé entre elles deux préparations, étalées l'une par l'autre et autant que possible de même épaisseur. Même en opérant ainsi il n'est pas certain que ces deux préparations contiennent le même nombre de Bacilles.

Il est donc nécessaire de faire un certain nombre de préparations et de comparer toujours, l'une à l'autre deux préparations étalées ensemble, puis colorées ensuite ensemble par la liqueur de ZIEHL, mais enfin traitées par des décolorants différents.

Voici quelques résultats :

Comparaison de préparations colorées par les diverses techniques.

I. a)	ZIEHL.....	27	Bacilles
b)	BIOT	32	Bacilles
II. a)	ZIEHL	22	Bacilles
b)	BIOT	20	Bacilles
III. a)	ZIEHL.....	36	Bacilles
b)	SCHULTE-TIGGES	49	Bacilles
IV. a)	ZIEHL	62	Bacilles
b)	SCHULTE-TIGGES	67	Bacilles
V. a)	ZIEHL.....	56	Bacilles
b)	SPENGLER-TRIBONDEAU	67	Bacilles
VI. a)	SCHULTE-TIGGES	64	Bacilles
b)	SPENGLER-TRIBONDEAU	58	Bacilles

Action des décolorants.

Pas de coloration de contraste

I. a)	Sulfite de soude.....	57	Bacilles
b)	Acide nitrique	47	Bacilles
II. a)	Sulfite de soude.....	44	Bacilles
b)	Acide nitrique	41	Bacilles
III. a)	Sulfite de soude.....	73	Bacilles
b)	Acide nitrique	52	Bacilles
IV. a)	Sulfite de soude.....	46	Bacilles
b)	Acide nitrique	30	Bacilles

Action du formol.

Pas de coloration de contraste

I. a) Formol et acide nitrique.....	28	Bacilles
b) Acide nitrique	23	Bacilles
II. a) Formol et acide nitrique.....	43	Bacilles
b) Acide nitrique	31	Bacilles

Action des colorants de contraste.

A. — Après décoloration par l'acide nitrique

I. a) Bleu de méthylène aqueux.....	31	Bacilles
b) Bleu de méthylène alcoolique.....	26	Bacilles
II. a) Bleu de méthylène aqueux.....	27	Bacilles
b) Bleu de méthylène alcoolique.....	44	Bacilles
III. a) Bleu de méthylène aqueux.....	21	Bacilles
b) Alcool picriqué	27	Bacilles
IV. a) Bleu de méthylène aqueux.....	26	Bacilles
b) Eau picriquée	30	Bacilles
V. a) Bleu de méthylène aqueux.....	34	Bacilles
b) Vert malachite	25	Bacilles

B. — Après décoloration par le sulfite de soude

I. a) Eau picriquée	82	Bacilles
b) Alcool picriqué	97	Bacilles
II. a) Bleu de méthylène aqueux.....	26	Bacilles
b) Eau picriquée	66	Bacilles
III. a) Vert malachite	49	Bacilles
b) Eau picriquée	62	Bacilles

Tous ces nombres n'affirment pas nettement la supériorité de certaines techniques sur les autres.

Toutefois, les Bacilles mis en évidence sont en général plus nombreux après décoloration par le sulfite de soude qu'après décoloration par l'acide nitrique.

Le formol rend plus foncée la couleur des Bacilles sans les faire paraître sensiblement plus nombreux.

Pour ce qui est des colorants de contraste, je puis dire que la solution alcoolique de bleu de méthylène (WEICHSSELBAUM) et la solution alcoolique de bleu de méthylène (ZIEHL) donnent sensiblement les mêmes résultats. Cependant pour obtenir des fonds bleus colorés avec la même intensité, il faut prolonger beaucoup plus longtemps l'action de la solution alcoolique¹ de bleu de méthylène que celle de la solution aqueuse de même concentration.

L'eau picriquée et l'alcool picriqué donnent des résultats égaux.

Le vert malachite donne la coloration diffuse la moins favorable à l'observation.

Dans l'ensemble, j'estime que les techniques de BIOT, SCHULTZ-TIGGES, SPENGLER-TRIBONDEAU sont des techniques recommandables; mais que celle de ZIEHL, toute ancienne qu'elle est, reste une technique sûre.

¹ On sait en effet que les matières colorantes donnent des solutions vraies dans l'alcool et des solutions colloïdales dans l'eau et de ce fait les solutions aqueuses ont un pouvoir tinctorial de beaucoup supérieur à celui des solutions alcooliques.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS

BUT DES MÉTHODES DE CONCENTRATION

Souvent l'examen direct des crachats, même plusieurs fois répété, n'a donné qu'un résultat négatif alors que les malades, d'après l'examen clinique, sont suspects de tuberculose. La présence constatée du Bacille de KOCH seule peut donner une certitude. Pour arriver vite à cette certitude, sans recourir aux procédés toujours longs et incertains de culture ou même à celui, tout aussi long, mais sûr, de l'inoculation au Cobaye, on se livre à l'examen microscopique après « *enrichissement* » des crachats en Bacilles tuberculeux.

L'examen microscopique du frottis, en effet, ne porte que sur une partie de l'expectoration, parfois infime, comparée à la masse expectorée, si l'on a, par exemple, affaire à un emphysémateux. L'échantillon prélevé peut, si la masse des crachats est relativement grande, ne contenir aucun Bacille. Un même malade enfin, peut rejeter des Bacilles à certaines heures de la journée seulement. De là, nécessité, dans la plupart des cas, de réunir sinon l'ensemble, au moins une bonne partie des crachats produits en 24 heures, et particulièrement ceux du matin au réveil, puis d'en extraire en quelque sorte tous les Bacilles comme une quintessence, en les sépa-

rant de la masse expectorée, sorte de gangue formée de mucus, de pus, de cellules épithéliales et d'eau dans laquelle ils sont répandus et généralement disséminés.

La « *concentration* » n'a pas d'autre but : obtenir un résidu minimum, mais contenant tous les Bacilles de la masse s'il en est. Ce résidu peut alors être étalé en entier sur une surface très réduite où les Bacilles se manifestent sûrement dans le champ de l'objectif.

Les principes sur lesquels reposent les techniques de concentration sont peu nombreux et, dans la pratique, c'est le plus souvent à celles dites d'« *homogénéisation* » que l'on s'en tient. Elles comportent deux temps :

1° La fluidification des crachats déterminée, soit par l'action de substances chimiques, soit par l'action de ferments ;

2° La collection des Bacilles. Pour cela, le crachat est liquéfié. Puis on laisse les Bacilles se déposer, ou bien, on centrifuge le liquide, on décante et l'on étale seulement le dépôt.

Mais il importe, avant de centrifuger, de se préoccuper de la densité du milieu. Le Bacille tuberculeux a une densité d'environ $D=1010$; si celle du liquide lui est inférieure, c'est le culot qu'on recueille pour examen ; si, au contraire, elle lui est supérieure, c'est à la surface qu'on peut prélever les Bacilles.

Agite-t-on avec un liquide léger : éther, acétone, ligroïne, au lieu de les centrifuger, les crachats liquéfiés, le dissolvant entraîne les Bacilles que l'on prélève alors entre la partie aqueuse et le liquide collecteur.

Parfois, au lieu de fluidifier les crachats, on les coagule et, après décantation de la partie aqueuse, on recherche les Bacilles dans le coagulum.

Plusieurs opérations peuvent aussi être combinées : à la coagulation succède la fluidification, ou bien la fluidification est suivie d'une précipitation.

Enfin, certains procédés que l'on désigne plus particulièrement sous le nom de « *procédés d'enrichissement* » indépendants des procédés d'homogénéisation et qui ont pour base l'action de la chaleur sur les crachats, supposent une fluidification de la masse quand la

température en est modérée, une coagulation quand la température en est élevée.

Les techniques de concentration du Bacille tuberculeux dans les crachats mettent donc en jeu, soit des phénomènes physiques, soit des phénomènes chimiques, soit, le plus souvent, phénomènes physiques et phénomènes chimiques combinés.

Les auteurs qui depuis 1886 ont créé ou modifié les procédés de concentration connus jusqu'ici, sont légion ; par une revue de leurs travaux, nous pourrions nous rendre compte de la diversité très grande, surprenante même, des moyens, des produits mis en œuvre dans un but unique.

CHAPITRE II

MÉTHODES DE CONCENTRATION DES BACILLES TUBERCULEUX DANS LES CRACHATS

Aperçu historique

La plupart des noms cités jusqu'ici à propos de la coloration du Bacille tuberculeux sont ceux de savants germains, car c'est en Allemagne que les recherches à ce sujet furent poursuivies avec la plus ardente émulation. Il en sera de même, au moins jusqu'à ces derniers temps, dans l'aperçu historique des travaux concernant « *l'enrichissement des crachats* » en Bacilles tuberculeux.

Dès 1884, UNNA (174) pour mieux étudier le Bacille de KOCH pense à l'isoler des tissus et entreprend la liquéfaction de fragments lupiques au moyen de la pepsine et de l'acide chlorhydrique.

Signalant en 1888 les travaux de BIEDERT (94) qui, le premier, réalisa en 1886, la liquéfaction des crachats par la lessive de soude, UNNA (175) prévoit l'essor futur des procédés d'homogénéisation : « *Certes, dit-il, avec le chauffage, le traitement par les acides, par les alcalis, la digestion, toutes les méthodes de différenciation préparatoire ne sont pas encore épuisées. Nous ne connaissons peut-être pas encore aujourd'hui tous les agents physiques ou chimiques qui peuvent nous venir en aide.* »

BIEDERT liquéfie les crachats par la lessive de soude diluée en prolongeant l'ébullition, laisse reposer et recueille le dépôt.

La même année (1886), l'Anglais PHILIPP (156) laisse simplement

les crachats dans une atmosphère humide à 37° C pendant 24 heures se liquéfier d'eux-mêmes sans l'addition d'aucun produit.

Tandis que BIEDERT (95) reprend son procédé en cherchant à le perfectionner, STROSCHEIN (170) considérant que l'action de la lessive de soude est trop énergique et nuit à la colorabilité des Bacilles, préconise l'emploi d'un mélange d'acide borique et de borax, alors que KÜHNE (139) se contente, en 1890, du borax seul.

Un an plus tard, MULHÆUSER (148) reprend le procédé de BIEDERT et VAN KETEL (135) fait le premier usage du phénol.

Pendant 3 années, il n'est publié aucun procédé nouveau, mais en 1895, on en voit paraître un certain nombre : SPENGLER (167) et PAULUS (154) recommandent la digestion artificielle des crachats par la pancréatine en milieu alcalin ; STRAUS (169), savant français, reprend le procédé de KÜHNE au borax qu'il modifie.

AMAN (82) procède à l'homogénéisation mécanique par la grenaille de plomb, avec collection par le chloroforme.

L'emploi de la centrifugeuse est introduit vers 1891 dans les laboratoires de STEINBECK et la centrifugation est alors, de plus en plus substituée dans les techniques d'homogénéisation des crachats, à la sédimentation. Elle figure dans la technique de d'ARRIGO et STAMPACCHIA en 1899 (83) et dans toutes les nouvelles techniques publiées en 1900 : celle de CZAPLEWSKI (107) à la soude avec neutralisation par l'acide acétique et celle de JOCHMANN (131) qui traite les crachats par un suc digestif artificiel.

A ce moment, à Limoges, de LANNOÏSE et GIRARD (141) utilisent pour la première fois l'eau de Javel qui fluidifie les crachats rapidement à froid, centrifugent, font agir ensuite sur le résidu la lessive de soude, puis centrifugent encore. L'emploi de l'eau de Javel était une nouveauté. La publication de ce procédé original passe pourtant inaperçue en France.

En 1901, QUENSEL (157) emploie le premier la formaline.

En 1902 apparaît en France, le premier procédé de collection en surface, celui de COURATTE-ARNAUDE (106) : liquéfaction à la lessive de soude puis addition, en agitant, d'alcool et d'éther, prélèvement enfin sans recourir à la centrifugation.

Puis HEMPEL (126) précipite la mucine des crachats, JOUSSET

(132-133) « lance », en 1903. « *l'Inoscopie* », fluidification par un suc gastrique artificiel fluoré, du mucus, des éléments cellulaires, non seulement dans les crachats, mais aussi dans le liquide pleural, le sang.

DILC (110) qui liquéfie les crachats par l'ammoniaque, est le premier à se préoccuper de l'importance du poids spécifique dans la collection des Bacilles et, pour les recueillir en surface, augmente la densité du liquide par une solution de chlorure de sodium.

BEZANCON et PHILIBERT (88) publient leurs premiers travaux sur une méthode à la soude la même année, et insistent aussi sur la notion de densité. NEBEL (150) s'inspire en 1904 de la même idée quand il recommande comme fluidifiant, l'eau de chaux avec collection par aspiration à travers une bougie BERKEFELD.

L'eau oxygénée, elle-même, est utilisée par SORGO puis SACHS-MUCKE (162).

En 1908, les procédés d'homogénéisation prennent tout à coup un grand essor.

UHLENHUTH et XYLANDER (172) ont remarqué que le Bacille tuberculeux résiste à l'action de « *l'antiformine* » produit antiseptique utilisé dans les brasseries, et proposent cet hypochlorite comme fluidifiant des crachats. Cette antiformine dont la formule n'est pas publiée est tout simplement une eau de Javel avec un excès de soude : le procédé d'UHLENHUTH et XYLANDER est, en somme, calqué sur celui que suivent en France depuis 1900, de LANNOÏSE et GIRARD à Limoges et G. THIRY à Nancy.

ELLERMANN et ERLANDSEN (113) publient la même année — 1908 — leur « *Doppelmethode* » : ils emploient successivement une solution diluée de carbonate de soude et une solution diluée de soude.

Le fluidifiant de NAKAO-ABE (149) est une solution de chlorure de sodium et de sublimé.

On voit bien paraître encore en 1909 le procédé de HAMMERL (124) à l'ammoniaque et à la soude; mais les chercheurs, pendant plusieurs années se préoccupent surtout de modifier et de perfectionner le procédé à l'antiformine. HÜNE — 1908-1909 — (128-129), MEYER — 1909 — (147), GÉRRES (120), PATERSON (153), BIÉROTTE (96), LAGRÈZE (140) en 1910, LORENZ (144) en 1911, emploient l'antiformine à des

taux différents et recueillent le culot de centrifugation, tandis que SEEMAN, — 1900 — (164) recourt à la sédimentation ; que HASERODT (125), BERNHARDT (87), JACOBSON (130) — 1909 — collectent les Bacilles en surface avec de la ligroïne ; KOSLOW (138) avec un mélange d'éther et d'acétone et LÖFFLER (143) dans une couche de chloroforme, 1910.

NEMMSER et MARTOS LISOWSKA (151) reprennent les méthodes de digestion artificielle en utilisant la trypsine. SCHNEIDER étudie l'action sur les crachats de l'antiformine à diverses concentrations. BEZANÇON et PHILIBERT (92) insistent en 1911, sur l'importance de la densité en reprenant leur méthode à la lessive de soude et en l'appliquant à l'homogénéisation des crachats. GAUSSEL et CORONE (118) simplifient la méthode de BEZANÇON et PHILIBERT en supprimant l'addition d'alcool, tandis que LUCAS (145-146) la complète par l'addition d'un sérum agglutinant.

Nous voyons ensuite FONTÈS (116) en 1914 combiner l'action de l'eau oxygénée à celle de la lessive de soude et BIERRY (97-98) opérer plus tard — 1916 — une précipitation fractionnée par l'acide acétique, après avoir liquéfié par un hypochlorite de soude. Cependant que Mlle GIRAUD et DARRIEN (119) homogénéisent les crachats par la pyridine et que CORDONNIER (104) en produit « *l'histolyse* » par son « *histoluol* » sorte d'antiformine.

Un procédé original apparaît en 1917 : DITTHORN et SCHULTZ (112) déterminent dans les crachats fluidifiés un précipité d'hydrate de fer qui entraîne les Bacilles. Bientôt SCHMITZ et KURT BRAUER (99-163) inspirés par les précédents, précipitent dans les crachats liquéfiés de l'alumine gélatineuse. SPEHL (165) revient à l'eau de chaux que NEBEL avait préconisée, GUY LAROCHE et VIRMEAUX (142) modifient le procédé de BEZANÇON et PHILIBERT en changeant le mode de collection, THOMAS (171) agit de même envers la méthode de STROSCHEIN, et Th. KOCH (136) modifie le procédé de VAN-KETEL à l'acide phénique.

GRYSEZ et BERNARD (123), en 1920, provoquent la digestion des crachats par un produit naturel : la bile de bœuf, à laquelle ils ajoutent de la teinture d'iode, tandis qu'HIRTSMANN (127), un an plus tard, l'utilise pure.

En quelques années on voit paraître un certain nombre de procédés nouveaux : d'abord, en 1919, ceux d'ALLÈGRE (81) à la soude, de GUELME et HOUAL (122) à l'antiformine avec épuisement par l'éther, puis en 1921, ceux de DARBÈS (108) à l'eau de Javel et de KHOURI (135) à l'hypobromite.

DISTASO (111), qui utilise la soude, et FAISCA (114) qui emploie l'antiformine, homogénéisent tous les deux les crachats sur la lame même.

Ensuite GORESCU (121) coagule la mucine et la liquéfie, FOUREST (117) emploie la lessive de soude comme fluidifiant et le chloroforme comme collecteur, PAPACOSTAS et GATÉ (152) utilisent l'eau de Javel, et RONCHÈSE (159) l'alcool sodé.

Mais les travaux qui paraissent maintenant en France, car c'est en France que depuis 3 ans les recherches relatives à la concentration des Bacilles sont poursuivies avec la plus grande activité, ont trait à la « lyse » des crachats. On a étudié leur « autolyse » spontanée, leur liquéfaction se produisant quand ils sont abandonnés à eux-mêmes, sans la présence d'aucun produit étranger : SABRAZÈS (161), FAVRE et DEVUNS (115) ou additionnés de glycérine : (STEICH et PIETSCH (168). L'« autolyse » des crachats est facilitée par la chaleur. C'est ainsi que BEZANÇON, PHILIBERT et MATHIEU (90-91) reprennent la méthode de PHILIPP (156) le contemporain de BIEDERT qui soumettait les crachats pendant 24 heures à l'étuve à une température de 37° C (ils les font aussi autolyser à 50°), que CAUSSADE et MADAME CRIBIER (103) additionnent de glycérine les expectorations avant de les mettre à l'étuve.

DESPEIGNES (109) soumettant tout simplement les crachats à l'autoclave pendant 20 minutes à une température de 120° provoque leur hydrolyse; et RENAUX (158) après 3 minutes seulement de semblable traitement, homogénéise par la soude.

CHAPITRE III

ESSAI DES DIVERSES MÉTHODES DE CONCENTRATION DU BACILLE TUBERCULEUX DANS LES CRACHATS

Classification. Conditions générales d'expérimentation

On a pu voir, par l'exposé chronologique succinct qui précède, quels sont les travaux auxquels a donné lieu la concentration du Bacille tuberculeux dans les crachats. Les principes en sont divers, comme les agents mis en œuvre.

Evidemment, chaque auteur ne publie un procédé nouveau que parce qu'il lui reconnaît, au moins en quelque point, une supériorité sur les autres procédés. Cependant des chercheurs qui essaient diverses techniques et les comparent, arrivent souvent à des résultats contradictoires, l'un recommande une méthode que l'autre condamne parce qu'inférieure et insuffisante.

Devant cette contradiction apparente, il m'a paru nécessaire d'étudier comparativement les nombreux procédés préconisés. Mes expériences ont porté sur 70 techniques.

Pour exposer ces techniques diverses, il était nécessaire de les classer.

Les partager en deux grands groupes : procédés physiques, procédés chimiques, m'eût, dès l'abord, assez séduite : certains procédés, en effet sont purement d'ordre physique, tel celui d'AMAN qui dissocie les crachats avec la grenaille de plomb, tels ceux qui consistent à coaguler la mucine par la chaleur, à entraîner les Bacilles par un précipité résineux. D'autres sont purement d'ordre

chimique, ceux qui fluidifient les crachats par des produits chimiques ou des ferments tels que la pepsine. Souvent les deux actions sont liées : ainsi dans l'autolyse à 37° et à 50° la chaleur accélère la vitesse de la réaction. En tout cas, la collection des Bacilles qui nécessite le plus souvent la sédimentation ou la centrifugation, étant toujours subordonnée à la notion de densité est une opération physique.

Dans l'impossibilité d'établir une classification nette basée sur la nature ou physique ou chimique des opérations, j'ai classé les différentes méthodes de la façon suivante :

- a) Procédés utilisant les alcalins : lessive de soude, hypochlorites, alcalins divers ;
- b) Emploi de produits divers ;
- c) Digestion artificielle ;
- d) Lyse des crachats ;
- e) Transformation des crachats à température élevée ;
- f) Procédés mixtes.

Mes expériences ont porté sur des crachats dans lesquels l'examen microscopique direct n'a révélé que peu de Bacilles tuberculeux, et dans quelques cas, sur des crachats purement négatifs à ce même examen.

J'ai répété mes expériences en moyenne 6 ou 7 fois pour chaque technique et, pour certaines, beaucoup plus encore.

J'ai centrifugé en des tubes coniques avec une centrifugeuse faisant 2.500 tours par minute et dont le rayon R mesure 12 centimètres.

Les tubes à centrifuger doivent être d'une propreté absolue, car il ne faut pas risquer de retrouver dans le culot des Bacilles provenant d'une opération antérieure.

Pour cela, ils séjournent, avec les capsules, les agitateurs et tout le matériel servant aux homogénéisations, dans le bain oxydant suivant :

Eau	1 litre.
Bichromate de potassium.....	200 gr.
Acide sulfurique	200 gr.

Ils sont, avant l'emploi, lavés longuement à l'eau distillée et séchés.

L'usage du densimètre n'est pas pratique en l'occurrence, car on dispose rarement d'une quantité de liquide assez grande. J'ai, somme toute, utilisé la méthode du ballon, pesant à la balance de précision le liquide contenu dans un ballon jaugé de 25 cm³.

Les lames utilisées pour les préparations sont rapidement trempées dans l'acide chlorhydrique commercial, puis lavées soigneusement, conservées dans l'alcool et flambées avant l'emploi. Ces précautions sont nécessaires, car l'adhérence à la lame du résidu d'homogénéisation, surtout quand la fluidification a été faite par la soude, est aléatoire.

Les préparations sont séchées pendant 24 heures à l'étuve à 37°, puis colorées.

Pour l'examen microscopique direct il est toujours fait deux préparations : l'une est colorée par la méthode de ZIEHL, l'autre par la méthode de SCHULTE-TIGGES. Après homogénéisation, les préparations obtenues sont colorées aussi par ces deux méthodes ; quand le sédiment est minime et ne donne qu'une préparation, elle est colorée suivant la méthode de ZIEHL.

Si l'auteur recommande un procédé spécial de coloration, j'emploie ce procédé, concurremment avec les techniques précédemment indiquées, et à l'examen direct, et après enrichissement.

En donnant le détail de chaque technique, j'indique la densité moyenne des homogénéisations, soit D, la nature du culot, la facilité d'étalement, l'adhérence à la lame, me réservant d'envisager pour toutes les méthodes à la fois, le rapport du nombre de Bacilles trouvés à l'examen microscopique direct, au nombre de Bacilles mis en évidence après concentration.

CHAPITRE IV

MÉTHODES UTILISANT DES PRODUITS ALCALINS

De tous les produits auxquels on a recours en vue de la concentration du Bacille tuberculeux dans les crachats, les produits alcalins, les premiers utilisés, ont été et demeurent les plus employés.

Tous, ils liquéfient la mucine, mais leur action est plus ou moins énergique, plus ou moins rapide. Parmi eux, ce sont la lessive de soude, et les hypochlorites dont l'usage est le plus fréquent.

LESSIVE DE SOUDE

Avec la lessive de soude qu'on emploie d'ordinaire diluée et à chaud, il faut, quand on désire recourir à la centrifugation, centrifuger longuement : de une demi-heure à une heure. Le culot de centrifugation est minime, grisâtre, légèrement visqueux ; après décantation du liquide, on l'aspire avec une pipette PASTEUR stérilisée ou on le prélève avec une anse de platine, ou mieux avec un fil de platine en spatule ; mais il s'étale difficilement et adhère mal à la lame. A l'examen microscopique de la préparation, on ne trouve, le plus souvent, aucun élément cellulaire ; si le fond est coloré par le bleu de méthylène, ce ne sont que fines granulations bleues sur fond blanc. L'acide picrique donne, comme toujours, un fond uniformément jaune. Les Bacilles sont, d'ordinaire, disséminés sur la préparation, même très nombreux, ils sont rarement groupés.

A. Collection du sédiment ou du culot de centrifugation.

Technique de Biedert : Procédé définitif, 1891 (95)

Densité ¹ = 1.010

On agite à froid à l'aide de l'agitateur, dans une capsule de porcelaine, 20 cm³ de crachats, avec 40 cm³ d'eau distillée et 4 à 8 gouttes de lessive de soude. On laisse reposer 5 minutes, puis on agite de nouveau. On porte à l'ébullition, puis on ajoute une nouvelle quantité d'eau distillée, 80 à 100 centimètres cubes. On laisse reposer dans un verre conique pendant 24 heures. Au fond du verre se trouve alors un léger précipité qu'après décantation, on fixe sur la lame avec un peu de crachat tel qu'il est expectoré. Ce mode de fixation toutefois n'est pas nécessaire quand les préparations sont abandonnées 24 heures à l'étuve à 37° C.

Tous les éléments du crachat, autres que les Bacilles sont parfaitement détruits.

Technique de Mulhæuser, 1891 (148). D=1.005

Un à trois centimètres cubes de crachats sont agités un grand nombre de fois avec 6 à 8 parties de lessive de soude à 0,20 %, on porte à l'ébullition, puis on laisse reposer.

Technique de Czaplewski, 1900 (107). D=1.005

La fluidification est obtenue comme dans la méthode de BIEDERT, mais on neutralise par l'acide acétique à 10 % en présence d'un peu de phénolphatléine comme indicateur. On centrifuge. La neutralisation par l'acide acétique complique sans utilité la technique. Les préparations obtenues par la technique de CZAPLEWSKI ont le même aspect que celles qu'on obtient avec la technique de BIEDERT.

Technique de Beitzke, 1902 (85). D = 1003

A un volume de crachats, on ajoute 3 volumes de lessive de soude à 0,20 % ; on agite une minute, puis on porte à l'ébullition dans

¹ Par abréviation j'écrirai D =... au lieu de Densité =...

une capsule de porcelaine. Le liquide, rougi par quelques gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaléine, est neutralisé par de l'acide acétique jusqu'à décoloration. Après avoir ajouté 2 volumes d'alcool à 95° pour un volume de liquide, on centrifuge.

Technique d'Ellermann et Erlandsen. 1908 (113)

1^{er} liquide, D=1000 2^e liquide, D=1006

Cette double méthode « *Doppelmethode* », comme l'ont nommée ses auteurs, nécessite deux centrifugations.

Agiter 10 à 15 cm³ de crachats avec moitié de leur volume d'une solution de carbonate de soude à 0,60 % et laisser, en flacon bouché, 24 heures à l'étuve à 37° C. Centrifuger, et après décantation, ajouter, pour un volume de dépôt, 4 volumes de soude à 0,25 % ; centrifuger à nouveau. Le culot final est très réduit, facile à étaler ; l'examen microscopique y révèle encore quelques leucocytes parce que la lessive de soude et le carbonate de soude employés en solutions très faibles n'ont pas d'action violente sur les crachats.

Par ce procédé, les manipulations sont, sinon compliquées, du moins très longues.

Technique de Hammerl, 1909 (124). D = 1003

Dans le procédé de HAMMERL, la lessive de soude n'est pas le seul auxiliaire.

Soient 5 cm³ de crachats à homogénéiser, on les dilue dans 50 cm³ d'eau, on ajoute 5 gouttes d'ammoniaque et 5 gouttes de lessive de soude, on fait liquéfier à 50°, en agitant. On centrifuge après avoir ajouté 1 cm³ d'acétone et l'on recueille le culot de centrifugation.

Technique de Bezançon et Philibert, 1911 (92-88-89) D = 999.

On mesure dans une éprouvette graduée, n cm³ de crachats et dans une autre 10 n cm³ d'eau.

On ajoute autant de gouttes de lessive de soude que l'on a de centimètres cubes de crachats.

Exemple : crachats	5 cm ³
eau distillée	50 cm ³
lessive de soude.....	V gouttes

On met dans une capsule de porcelaine, les crachats avec 25 cm³ d'eau et la soude ; on ajoute peu à peu les 25 cm³ d'eau restants, tandis que la capsule est maintenue pendant 10 minutes sur la flamme d'un bec BUNSEN à une température douce. On agite constamment.

Après refroidissement, on prend la densité du liquide : si elle est trop élevée, on la ramène à 999 par l'addition d'alcool à 50°, puis on répartit le liquide en des tubes coniques et l'on centrifuge de trois quarts d'heure à une heure.

Cette technique a remplacé dans la pratique toutes celles qui l'avaient précédée et qui sont aujourd'hui complètement abandonnées.

Technique de Bezançon et Philibert, modifiée par Gaussel et Corone
1913 (105-118). D = 1004.

GAUSSEL et CORONE considérant, après de nombreuses expériences, que le liquide d'homogénéisation a toujours une densité peu élevée et qu'on est sûr de recueillir par centrifugation tous les Bacilles, s'il en est dans le culot, estiment qu'il est superflu de prendre la densité et de la corriger par l'addition d'alcool à 50°. Les manipulations se trouvent, par là même, plus simples et plus rapides. Les résultats sont les mêmes : le culot minime obtenu ne contient plus d'éléments cellulaires, les Bacilles se détachent très nettement sur le fond de la préparation.

Avant d'étudier les procédés d'homogénéisation, j'ai beaucoup utilisé cette technique.

Technique de Fontès, 1914 (procédé définitif) (116). D = 1002.

Après avoir agité les crachats (1 cm³) avec 5 cm³ d'une solution décinnormale de soude, on ajoute 5 cm³ d'eau oxygénée et l'on agite à nouveau. On porte à 45-50° C. jusqu'à complet dégagement de l'oxygène, puis on centrifuge 15 minutes. Le culot peu important s'étale bien, quelques éléments cellulaires y sont encore intacts.

Technique de Sopakar, 1916 (165). D = 1000.

Le procédé consiste à mélanger, en parties égales, les crachats et

une solution de soude à 5 %, à laisser le mélange une demi-heure dans l'étuve à 37° et à neutraliser par une solution d'acide chlorhydrique à 5 %. Le terme de la neutralisation est indiqué par l'apparition d'un très léger trouble laiteux dans le liquide qui est ensuite centrifugé à grande vitesse.

L'auteur recommande son procédé pour la préparation des crachats avant l'ensemencement, mais il est tout aussi bien applicable à la liquéfaction des crachats en vue de la concentration des Bacilles tuberculeux.

Technique d'Allègre, 1919 (81). D = 990.

L'homogénéisation se pratique dans un large tube à essai et non dans une capsule ouverte. Aux crachats dissociés mécaniquement par agitation en présence d'eau distillée, on ajoute de la lessive de soude à raison de 1 goutte à 1 goutte $\frac{1}{2}$ par cm^3 de crachats. On fait tiédir la masse, mais il est indispensable de ne pas atteindre une température telle que les albumines puissent être coagulées. On ajoute alors, progressivement, un liquide destiné à abaisser la densité du mélange et de formule :

Eau distillée	20 cm^3 .
Alcool à 95°.....	5 cm^3 .
Acétone	5 cm^3 .

à raison de 60 à 80 cm^3 de liquide pour 10 cm^3 de crachats. On peut filtrer sur un petit tampon de coton hydrophile stérile pour retenir les impuretés, puis on centrifuge à grande vitesse pendant 20 minutes.

Le résidu complètement étalé sur lames est fixé, puis lavé à l'eau distillée avant la coloration par le Ziehl à chaud.

J'ai suivi le procédé tel que l'indique l'auteur et ne vois pas la nécessité du lavage des préparations à l'eau distillée après fixation.

B. Collection à la surface.

Technique de Couratte-Arnaude, 1902 (106)

Dans le procédé de COURATTE-ARNAUDE, comme dans la tech-

nique de BEZANÇON et PHILIBERT, la lessive de soude est employée à 1/100 et à chaud, mais on porte le liquide à l'ébullition. Après refroidissement une partie de la solution (voir exemple : données BEZANÇON et PHILIBERT) soit 20 centimètres cubes, est versée dans un tube à essai avec :

Acide acétique	- 4 gouttes.
Ether	4cm ³

On bouche le tube avec le doigt protégé contre le contact du liquide par un papier fort et on l'agite fortement. Alors, naissent dans le liquide des petits flocons grisâtres qui gagnent rapidement la surface ; on les dissocie par un peu de lessive de soude, puis on ajoute un excès d'éther et l'on agite à nouveau vigoureusement. Entre le liquide et l'éther se forme une pellicule qui contient les Bacilles. Il est assez difficile d'enlever cette pellicule avec le fil de platine sans la diluer en partie dans le liquide : on ne l'obtient complètement que rarement. Étalée, elle adhère bien à la lame.

Technique de Guy Laroche et Virmeaux, 1918 (142).

Voici les différents temps de la technique de GUY LAROCHE et VIRMEAUX :

1° Homogénéiser par la lessive de soude en suivant le procédé de BESANÇON et PHILIBERT ;

2° Ajouter Na Cl cristallisé à la dose de 0 gr. 25 par centimètre cube, agiter jusqu'à dissolution complète du chlorure. L'auteur recommande l'emploi de Na Cl « chimiquement pur », mais vraiment, cela n'est pas utile pour une homogénéisation ;

3° Verser le liquide dans un tube à essai, après refroidissement, ajouter quelques gouttes d'éther et de ligroïne en quantités égales ; bien agiter en se protégeant le doigt avec un papier épais plié en quatre ;

4° Laisser les Bacilles de KOCH se collecter lentement pendant 6 heures ;

5° Prélever la pellicule grisâtre qui se forme sous la couche de ligroïne, la déposer sur lame, sécher à l'étuve, fixer par flambage à l'alcool ;

6° Plonger la lame dans l'eau distillée pour dissoudre les crachats de chlorure et colorer.

La couche intermédiaire formée de petits grumeaux inégalement répartis sur une légère pellicule, se recueille difficilement ; les préparations se détachent souvent des lames au cours de la coloration.

Technique de Fourest, 1923 (117)

Dans un tube à centrifuger, on agite 1 à 2 centimètres cubes de crachats avec une quantité égale de lessive de soude, puis, quand on a une masse homogène, on remplit d'eau jusqu'au tiers supérieur du tube. Après mélange rapide, on ajoute 1 à 2 centimètres cubes de chloroforme, on centrifuge deux minutes à grande vitesse.

A la partie supérieure du chloroforme, entre celui-ci et le liquide aqueux, se forme une pastille épaisse, homogène, qui s'enlève d'un seul morceau, on la répartit sur plusieurs lames. Elle est facile à étaler et donne des préparations épaisses mais adhérentes.

Technique de Ronchèse. Alcool sodé, 1924 (159)

RONCHÈSE propose d'homogénéiser à froid les crachats par de l'alcool faible sodé, de formule :

Eau distillée	75 cm ³
Alcool à 95°	25 cm ³
Lessive de soude	5 cm ³

puis à provoquer, par addition d'acétone, la formation d'un coagulum léger dans lequel on recherche les Bacilles. Il donne de sa technique une variante qui en diffère par le mode de collection, mais recommande le procédé qui dispense de la centrifugation.

Collection sans centrifugation. — Dans un verre conique, le réactif fluidifiant est ajouté par petites doses successives à l'échantillon des crachats. On agite. La liquéfaction s'opère peu à peu. Cesser l'addition du fluidifiant dès l'obtention d'un liquide filant ; pour ce résultat, il faut de 3 à 6 volumes d'alcool sodé, selon la consistance des crachats.

A l'aide d'une pipette à extrémité effilée, verser, avec précaution, de l'acétone à la surface des crachats fluidifiés, sans que les deux liquides se mélangent ; puis, avec la même pipette, déposer au fond

du verre une nouvelle quantité d'acétone qui, traversant les crachats vient à la surface et doit entraîner les Bacilles s'il s'en trouve.

Prélever la pellicule qui s'étale à la limite des deux liquides, l'égoutter puis l'étaler après avoir mis sur la lame une petite goutte d'alcool. Triturer la pellicule dans l'alcool avec un fil de platine et faire l'étalement d'une surface aussi réduite que possible. La pellicule à recueillir est excessivement ténue ; étalée sur lame, elle y adhère mal. Colorer par la méthode de ZIEHL, mais remplacer le bleu de méthylène par une solution d'acide picrique.

Collection des Bacilles par centrifugation. — Au liquide d'homogénéisation, on ajoute de l'acétone qui en abaisse la densité, et dans ce cas, au lieu d'obtenir en suspension une mince pellicule, on obtient un résidu minime et grisâtre en culot.

C. Homogénéisation sur lames.

Technique de Distaso, 1920 (111)

Sur la lame même on mélange une parcelle de crachats et une goutte de solution de soude à 5 % et l'on soumet à une douce chaleur. La préparation très épaisse ainsi obtenue est séchée à l'étuve, puis on procède à sa coloration suivant les indications données par l'auteur :

1° Immersion de la préparation dans la liqueur de ZIEHL à 38° C ;
2° Après lavage dans un mélange à parties égales d'eau et de liqueur d'ESBACH, décoloration par l'acide nitrique à 25 % poussée seulement jusqu'à l'obtention d'une teinte légèrement rose. Lavage à l'eau pure, puis à l'alcool à 60° et de nouveau à l'eau ;

3° Coloration de contraste par une minute d'immersion dans une solution de vert malachite ainsi formée : 1 partie de solution alcoolique saturée dans 19 parties d'eau.

Tout d'abord j'ai suivi rigoureusement les indications de l'auteur, puis j'ai modifié le procédé en colorant par la méthode de ZIEHL et par celle de SCHULTE-TIGGES. La technique ainsi modifiée m'a donné de bien meilleurs résultats que la technique primitive de l'auteur.

HYPOCHLORITES

Ce groupe comprend l'eau de Javel, le premier hypochlorite utilisé pour la fluidification des crachats, et l'antiformine. Ces deux hypochlorites ont, pour l'usage qui nous intéresse, les faveurs les plus générales.

Les hypochlorites agissent en général rapidement, même à froid, et donnent, après 10 minutes à 15 minutes de centrifugation, un culot grisâtre, granuleux, d'un étalement facile, un peu plus important que celui que l'on recueille après traitement par la soude, quoiqu'il soit minime encore. Après coloration, la préparation ne présente qu'un fond généralement dépourvu d'éléments cellulaires, de germes étrangers, de Levures si les crachats en contenaient et sur lequel les Bacilles apparaissent en amas.

EAU DE JAVEL

L'Eau de Javel du commerce n'est pas un produit défini : j'ai titré, par la méthode de GAY-LUSSAC celle dont j'ai fait usage, elle contenait, pour 100 Cl = 0 gr. 95.

A. Collection par centrifugation.

Technique de De Lannoïse et Girard, 1900 (141)

Premier liquide, D=1.012. Deuxième liquide, D=1.020

Cette méthode nécessite deux centrifugations : on homogénéise à froid un volume de crachats par 10 volumes d'eau de Javel à un tiers, en agitant dans un verre à pied.

Quand, au bout d'un quart d'heure environ, la fluidification est parfaite, on centrifuge cinq minutes dans un tube conique puis on décante le liquide et l'on dépose sur le culot 5 à 6 gouttes de solution normale de soude, on remplit aussitôt d'eau distillée, on agite, on centrifuge à nouveau.

Le culot très minime, enlevé en entier par le fil de platine, est étalé facilement sur une seule lame où il adhère bien. Les éléments cellulaires y sont parfaitement détruits.

Technique de Papacostas et Gâté, 1923 (152) $D = 1.020$

La fluidification se fait à froid par agitation vigoureuse dans un flacon bouché à l'émeri de un volume de crachats avec un égal volume d'eau de Javel. Les crachats se désagrègent rapidement, le mélange devient transparent et se couvre d'une épaisse couche mousseuse. Quand la mousse est tombée et que le mélange qui s'est échauffé est refroidi, on le répartit dans des tubes à centrifuger où l'on verse, pour abaisser la densité, de l'alcool à 95° ou de l'alcool dénaturé en quantité telle qu'on obtienne un mélange comprenant crachats, eau de Javel, alcool par quantités égales. Une centrifugation de 2 à 3 minutes suffit. On décante, on lave le culot à l'eau physiologique et l'on centrifuge encore rapidement.

Le culot de centrifugation adhère bien au porte-objet. Les préparations obtenues par cette technique ont le même aspect au microscope que celles qui sont données par la technique de DE LANNOÏSE et GIRARD.

B. Collection à la surface.

Technique de Darbès, 1921 (108) D , avant addition d'éther = 1130

Dans un verre à pied, on triture avec l'agitateur, 10 cm³ de crachats et 20 cm³ d'eau de Javel. « Si le crachat est trop épais, dit l'auteur, ajouter une ou deux gouttes de lessive de soude et chauffer légèrement sans cesser de remuer. » Mais généralement, l'action de l'eau de Javel suffit à produire un liquide homogène. On répartit ce liquide dans six tubes, puis on verse en chacun d'eux, pour élever la densité, en volume égal au volume du mélange, une solution de densité élevée : solution saturée de chlorure de sodium ou solution d'hyposulfite de soude à 50 %. J'ai surtout employé cette dernière. On ajoute 1 à 2 cm³ d'éther dans chaque tube et on agite vigoureusement. Il se forme à la limite inférieure de l'éther une pellicule blanchâtre, sans consistance, difficile à séparer du liquide avec le fil de platine en spatule, mais adhérent bien à la lame.

ANTIFORMINE

L' « *antiformine* » préconisée en 1908 comme fluidifiant des crachats par des bactériologistes allemands était, à l'origine, un produit spécialisé : on en donnait parfois la composition probable, jamais la formule exacte.

Certains auteurs, ensuite, analysant l'antiformine, ont préparé ce liquéfiant pour leur usage et en ont publié la composition.

J'ai eu, avant d'expérimenter les techniques dans lesquelles entre ce produit, à préparer plusieurs antiformines ; pour chacune d'elles, j'ai dosé le chlore par le procédé de GAY-LUSSAC..

Antiformine formule Paterson, 1910 (153) Cl=0 gr. 76 %

Carbonate de soude	10 gr.
Carbonate de chaux	40 gr.
Eau distillée	400 cm ³

On dissout d'une part le chlorure de chaux dans 250 cm³ d'eau, d'autre part le carbonate de soude dans 150 cm³ d'eau. On mélange les deux solutions et l'on filtre.

Antiformine formule Barberio, 1914 (84) Cl = 0 gr. 83 %

Préparer deux solutions, l'une de carbonate de soude, 20 grammes dans 100 cm³ d'eau tiède, l'autre de 20 grammes de chlorure de chaux dans 50 cm³ d'eau, les mélanger. Laisser reposer 24 heures et filtrer.

« *Histoluol Cordonnier* » 1917 (104) Cl=1 gr. 39 %

1° Triturer au mortier 25 grammes de chlorure de chaux dans 250 cm³ d'eau, filtrer après trois heures de contact. On a ainsi la solution A ;

2° Après lavage du résidu par 125 cm³ d'eau distillée on a la solution B ;

3° Ajouter la solution B à la solution A, pour avoir la solution C ;

4° D'autre part, dissoudre dans 125 cm³ d'eau, 50 grammes de carbonate de soude. Soit D la solution obtenue ;

5° Mélanger les solutions C et D, laisser déposer, filtrer, compléter le volume à 500 cm³ avec de l'eau distillée.

L' « *Histoluol* » obtenu est alors prêt à être employé.

« *Antiformine de Lorenz* » formule donnée sous ce titre
par ROSENKRANZ, 1922 (160). Cl.=2 gr. %

Chlorure de chaux	215 gr.
Lessive de soude	286 gr.
Eau	2.000 gr.

Tandis que je n'ai fait usage des solutions préparées suivant les formules précédentes que pour essayer les techniques des auteurs qui les ont indiquées, j'ai utilisé celle-ci dans tous les cas où la solution à employer n'était pas précisée.

Je cite ici une autre formule d'*Antiformine* bien que je ne l'aie pas employée ; elle a été publiée tout récemment par MM. CALMETTE, BOQUET et NÈGRE (102). On obtient cette antiformine en mélangeant à parties égales une solution à 15 % de soude caustique et la liqueur chlorurée calcique et sodique de la pharmacopée anglaise. Cette liqueur se prépare de la façon suivante :

D'une part, dissoudre 60 grammes de carbonate de soude dans 100 cm³ d'eau distillée ; d'autre part, triturer 40 grammes de chlorure de chaux sec dans 300 cm³ d'eau distillée.

Filtrer chacune des deux solutions, les mélanger et à nouveau, filtrer le mélange.

A. Collection du culot de centrifugation ou du sédiment.

Technique d'Uhlenhuth et Xylander, 1908 (172-173). D = 1.040

Dans cette technique, on fluidifie les crachats à froid par l'antiformine. On ajoute aux crachats : 20 à 30 cm³, suivant leur consistance, 15 cm³ d'antiformine et on complète le volume du mélange à 100 cm³ par de l'eau distillée.

Après 3 à 5 heures de contact, on centrifuge pendant un quart d'heure.

Technique de Hüne. — 1^{er} procédé. 1908 (128). D = 1.030

Diluer les crachats dans au moins 10 fois leur volume d'eau, puis ajouter de l'antiformine à raison de 20 cm³ pour 100 cm³ du mélange total : crachats, eau, antiformine. Agiter, laisser déposer et étaler le sédiment recueilli après décantation.

Technique de Hüne. — 2^e procédé, 1909 (129). D = 1.032

Hüne modifie légèrement sa technique, en portant la proportion d'antiformine à 25 % au lieu de 20 %. On collecte les Bacilles par centrifugation du liquide d'homogénéisation et on lave plusieurs fois le culot à l'eau distillée avant étalement. Ces lavages ont pour but de faciliter l'adhérence de la préparation à la lame.

Technique de Seemann, 1909 (164). D = 1.030

Dans un verre conique, on triture à l'agitateur des crachats, avec, suivant leur consistance, 15 à 20 fois leur volume d'une solution d'antiformine.

Au bout de quelques heures, un précipité s'est formé que l'on recueille après décantation. Il est plus pratique, si on le peut, de centrifuger. A défaut de centrifugation, un repos de 24 heures est nécessaire pour qu'on puisse recueillir le sédiment.

Technique de Paterson, 1910 (153). D = 1.028

La fluidification des crachats s'opère dans un tube à centrifuger que l'on bouche et laisse 24 heures à la température du laboratoire. On fluidifie 10 cm³ de crachats par 2 cm³ 5 de solution d'antiformine suivant la formule de l'auteur. Si les crachats sont épais on en prend moins de 10 cm³, mais on dilue à 10 cm³ avec de l'eau distillée.

Après décantation, le culot est à deux reprises lavé à l'eau distillée et centrifugé, enfin, étalé.

Technique de Lorenz, 1911 (144) D = 1.020

LORENZ fluidifie les crachats à chaud :

Agiter vigoureusement les crachats (de 2 à 10 cm³) avec une

quantité double ou triple d'antiformine¹ à 15 %. Chauffer le mélange jusqu'à ébullition, puis centrifuger un quart d'heure.

Le culot de centrifugation est moindre que celui qu'on obtient par les autres procédés à l'antiformine.

Technique de Barberio, 1914 (84). $D = 1.022$

On mélange dans un flacon 20 cm³ d'antiformine¹ et 5 cm³ de crachats, la fluidification est presque instantanée. On centrifuge, puis on lave le culot à l'eau distillée, en centrifugeant encore jusqu'à disparition de la réaction alcaline : cette opération est longue, la réaction alcaline subsiste encore après trois et même quatre lavages.

L'adhérence parfaite de la préparation est d'ailleurs assurée sans lavages du culot, si, comme je le fais toujours, on laisse les préparations sécher 24 heures à l'étuve.

Technique de Cordonnier, 1917 (104) $D = 1.030$

L'« histoluol » dont j'ai donné précédemment le mode de préparation, est, en somme, une sorte d'antiformine.

Dans un flacon bouché à l'émeri, on agite fortement un volume de crachats avec un demi-volume d'« histoluol » et des perles de verre. La liquéfaction est parfaite et presque instantanée et ce n'est que dans des cas très rares que l'addition d'une nouvelle dose d'histoluol est nécessaire. On centrifuge un quart d'heure et l'on étale le culot.

L'auteur recommande, après coloration par la fuschsine de ZIEHL, de décolorer les préparations par l'une ou l'autre des solutions suivantes :

1° Acide lactique	2 gr.
Alcool à 95°	100 cm ³

ou

2° Bisulfite de soude cristallisé	1 gr.
Eau distillée	60 cm ³
Alcool à 95°	10 cm ³

et de recolorer par une solution de bleu de méthylène.

¹ J'ai employé la solution dont j'ai donné plus haut la formule.

¹ Voir plus haut formule Barberio.

Le premier décolorant ne présente aucun avantage sur l'acide nitrique à un tiers employé dans la technique habituelle de ZIEHL-NEELSEN, non plus que le deuxième sur la solution de sulfite de soude utilisée dans la technique de SCHULTE-TIGGES.

Parmi les techniques qui utilisent une antiformine, celle de CORDONNIER est une des plus rapides.

Technique du Professeur Cabrette, 1922 (101). $D = 1.030$

Traiter, dans un tube à centrifuger, un volume de crachats avec un volume égal d'une solution d'antiformine à 30 %. Après avoir agité, pendant 2 à 3 minutes, mettre le tube à l'étuve à 37° C. L'en retirer le lendemain, centrifuger, laver le culot à l'eau et centrifuger à nouveau.

B. Collection à la surface.

Technique d'Haserodt, 1909 (125)

On ajoute à un volume de crachats, 3 ou 4 volumes d'antiformine à 5 %. On agite le mélange puis on le laisse 24 heures à l'étuve à 37° C. On verse alors 10 cm³ du mélange dans un tube à essai, on ajoute 1 à 3 cm³ de ligroïne, on agite, puis on laisse 10 minutes au bain-marie à 60°. Une mince pellicule se forme entre la partie aqueuse et la ligroïne.

Cette pellicule est très difficile à recueillir et se détache presque toujours de la lame porte-objet.

Technique de Jacobson, 1909 (130)

En un tube à essai, aux crachats déjà dilués dans de l'eau distillée, ajouter de l'antiformine à 40 % à raison de un volume pour 5 volumes de crachats. Tenir le tube bouché; agiter de temps en temps. Au bout de 2 à 3 heures, verser de la ligroïne de façon à en avoir une couche de un demi-centimètre de haut. Agiter encore, laisser reposer une demi-heure à l'étuve, prélever et étaler la pellicule intermédiaire.

Cette pellicule est d'un prélèvement excessivement difficile et n'adhère pas à la lame porte-objet.

Technique de Bernhardt, 1909 (87).

Ici la solution d'antiformine employée est à 20 % : il en faut 20 cm³ pour 5 cm³ de crachats. Le mélange est agité de temps en temps et, quand il est bien homogène, additionné d'un peu de ligroïne et agité à nouveau. Au bout de 20 à 30 minutes de repos, la partie aqueuse est au fond du tube, la ligroïne à la surface et une fine pellicule les sépare : c'est elle qu'on recueille et qu'on étale, mais comme dans le cas précédent, elle n'adhère pas au porte-objet.

Technique de Loeffler, 1910 (143).

Pendant quelques minutes, agiter une partie de crachats (de 20 à 30 cm³) avec, suivant leur consistance, 2 ou 3 parties d'antiformine à 15 % jusqu'à homogénéité du mélange que l'on porte ensuite à l'ébullition.

Après refroidissement, prélever 10 cm³ du liquide auquel il faut ajouter 1 cm³ 5 du mélange suivant :

Chloroforme	10 cm ³
Alcool à 95°	90 cm ³

Agiter et collecter la couche grisâtre qui se trouve entre le chloroforme et le liquide aqueux. Cette couche s'étale facilement et adhère bien à la lame.

Technique de Koslow, 1910 (138).

On fluidifie 5 parties de crachats par une d'antiformine. On ajoute, après homogénéisation, un volume d'eau double de celui du liquide obtenu. L'antiformine se trouve donc dans la proportion d'environ 7 %. On prélève 10 cm³ de ce liquide d'homogénéisation dilué, que l'on verse dans un tube à essai et auxquels on ajoute 1 à 2 cm³ d'un mélange acétone-éther à parties égales.

On agite, et après repos, on collecte la mince couche grisâtre qui recouvre le liquide aqueux. Difficile à isoler, cette couche adhère mal à la lame.

C. Épuisement par l'éther.

Technique de Guelmé et Houal, 1919 (122).

Triturer 20 cm³ de crachats avec 20 cm³ d'antiformine à 40 %, jusqu'à obtention d'un liquide homogène. Ajouter 20 cm³ d'alcool à 60° ; agiter le mélange, puis le verser dans une ampoule à décantation.

Ajouter 20 cm³ d'éther dans l'ampoule, agiter, laisser échapper les gaz en soulevant le bouchon, puis laisser reposer quelques minutes. Alors apparaît, entre le liquide aqueux et l'éther, une couche grisâtre. Laisser s'écouler par le robinet la partie aqueuse, et recueillir dans un verre de montre la couche bacillifère et l'éther ; y joindre la petite quantité d'éther avec laquelle on rince l'ampoule pour enlever les derniers fragments de la pellicule qui peuvent y adhérer encore. Laisser l'éther s'évaporer ; prélever la « pâte » qui reste au fond du verre de montre et l'étendre sur la lame. La « pâte » s'étale très facilement et donne une préparation assez épaisse dont l'adhérence est parfaite.

Evidemment, il faut prendre en manipulant l'éther les précautions d'usage et se tenir loin de toute flamme.

D. Homogénéisation sur lames.

Technique de Faisca, 1921 (114).

Technique analogue à celle de Distaso. Faisca emploie l'antiformine à 15 % au lieu de la soude à 5 % utilisée par DISTASO.

Une petite quantité de crachats est, avec le fil de platine, mélangée sur lame à 2 ou 3 gouttes d'antiformine, tandis que l'on chauffe légèrement au-dessus de la flamme veilleuse d'un bec BUNSEN. Quand cette « pâte » est homogène, on l'étale uniformément. On obtient une préparation très épaisse.

PRODUITS ALCALINS DIVERS

BORATE DE SOUDE ET ACIDE BORIQUE

A. Centrifugation ou sédimentation.

Technique de Kühne, 1890 (139). $D = 1.012$

On agite un volume de crachats avec un volume d'une solution saturée de borax. Après un repos de 10 minutes, on agite encore et l'on centrifuge. On obtient alors, en même temps qu'un culot abondant et visqueux, une pellicule grisâtre superficielle.

A l'examen microscopique, on constate avec de nombreux éléments cellulaires inaltérés, la présence des Bacilles et dans le culot, et dans la pellicule.

Technique de Straus, 1895 (169). $D = 1.012$

Procédé différant du précédent seulement par le mode de collection. On laisse le liquide reposer dans un verre conique. Le sédiment est important et visqueux.

Technique de Stroschein, 1889 (170). $D = 1.035$

STROSCHER emploie, comme fluidifiant des crachats, une solution proposée par WENDRINER (176) pour la conservation des urines albumineuses et qui se prépare de la façon suivante : 8 grammes de borate de soude et 12 grammes d'acide borique dissous dans l'eau chaude, puis addition de 4 grammes de borate et filtration. A un volume de crachats, STROSCHER ajoute un volume de cette solution borico-borâtée et deux volumes d'eau distillée. On centrifuge. Le culot est très abondant. Beaucoup d'éléments cytologiques des crachats sont restés intacts.

B. Collection à la surface.

Technique de Thomas, 1918 (171). $D = 1.002$

La solution fluidifiante est celle de WENDRINER, mais la technique est différente :

1° Dans un flacon bouché à l'émeri, dissocier les crachats avec des perles de verre, en agitant vigoureusement. Ils deviennent liquides, soit A le liquide obtenu.

2° Ajouter aux crachats dissociés un volume égal de solution borico-borotée ; agiter jusqu'à fluidification parfaite. On a alors le mélange B ;

3° Enfin, ajouter au mélange B de la glycérine officinale en quantité égale à celle du liquide contenu dans le flacon. Agiter de nouveau. Soit C le nouveau mélange ;

4° Répartir le mélange dans les tubes à centrifugation et verser dans chacun d'eux, environ 2 cm³ d'éther et agiter. Ce mélange final, soit D, est centrifugé 5 minutes.

On n'obtient pas de culot de centrifugation, mais, entre le liquide aqueux et l'éther, une pellicule assez épaisse, mousseuse, s'enlevant d'une seule pièce, s'écrasant très facilement, adhérant bien à la lame. L'examen microscopique y décèle des éléments cellulaires encore intacts.

AMMONIAQUE

Technique de Dilg, 1903 (110). $D = 1.002$

« *L'expectoration à homogénéiser est agitée à froid avec quelques gouttes d'ammoniaque (une goutte par centimètre cube environ). Après fluidification, on répartit le liquide dans les tubes à centrifuger, en ajoutant dans chaque tube une solution de chlorure de sodium à 25 % en quantité égale à celle du crachat fluidifié. Centrifuger, puis rechercher les Bacilles à la partie supérieure du tube.* »
Telle est la technique de l'auteur.

La fluidification est très lente à froid ; il y a avantage à opérer au bain-marie à 50°. Après centrifugation, on obtient toujours un

culot peu important, visqueux et une pellicule mince en surface. On trouve dans le culot et la pellicule avec les Bacilles, des leucocytes et des cellules épithéliales encore nombreux.

SUBLIMÉ ET CHLORURE DE SODIUM

Technique de Nakao-Abe, 1918 (149). $D = 1.012$

Dans un flacon de 100 cm³ à large ouverture et bouchant à l'émeri, à 10 cm³ de crachats, ajouter 15 à 30 cm³ de la solution suivante :

Bi-chlorure de Mercure.....	2 gr.
Chlorure de Sodium.....	10 gr.
Eau distillée	1 litre

Après avoir agité 10 minutes, prélever 15 cm³ du mélange et les centrifuger 10 minutes.

Le culot de centrifugation est peu abondant, assez visqueux ; la destruction des éléments cellulaires, comme avec la technique de DILG, n'est pas parfaite.

EAU DE CHAUX

Technique de Spehl, 1918 (165). $D = 1.002$

Cet auteur, estimant que les produits ordinairement employés pour les homogénéisations risquent d'attaquer le Bacille tuberculeux lui-même, propose comme une nouveauté l'emploi de l'eau de chaux qui remonte cependant à 1903 avec NEBEL !

Pour étudier la méthode de NEBEL-SPEHL, j'ai utilisé l'eau de chaux officinale qui contient 1 gr. 69 d'hydroxyde de calcium par litre.

On verse dans un tube à centrifuger un volume de crachats, et, suivant leur consistance, 5 à 10 volumes d'eau de chaux. On porte le mélange à 56° en agitant de temps en temps jusqu'à

fluidification complète, ce qui demande 2 ou 3 heures. On centrifuge et l'on étale le culot.

Ce culot, peu important, est granuleux et s'étale facilement ; la préparation présente quelques éléments cellulaires. Si les crachats en contenaient, tous les germes autres que le Bacille tuberculeux sont encore intacts et colorés en bleu par le bleu de méthylène après coloration par la méthode de ZIEHL.

L'auteur conseille de colorer la préparation suivant une technique spéciale qui met en évidence les granulations de MUCH. Le procédé de SPEHL est plus long, plus délicat que ceux de ZIEHL et de SCHULTE-TIGGES et ne m'a pas donné de résultats meilleurs.

HYPOBROMITE DE SOUDE

Technique de Khouiri, 1921 (135). $D = 1.034$

L'auteur a eu l'idée d'employer l'hypobromite de soude qui sert au dosage de l'urée : (Br. 1 cm³, lessive de soude 10 cm³, eau distillée 10 cm³).

Dans un flacon à large goulot gradué de 5 en 5, on met 5 cm³ de crachats, et si ceux-ci sont muqueux ou aqueux, 0 cm³ 5 d'hypobromite ; s'ils sont très épais, purulents, on les dilue avec de l'eau distillée et l'on ajoute l'hybromite dans la proportion de 15 %.

On peut, soit abandonner le mélange à lui-même pendant 24 heures, soit laisser quelques heures à l'étuve à 50° C en agitant de temps en temps, soit mettre 10 minutes au bain-marie bouillant.

Dans tous les cas, on centrifuge un quart d'heure le liquide obtenu après addition d'un peu d'alcool à 50°.

Le culot est minime, granuleux, facile à étaler ; la destruction de tous les éléments autres que les Bacilles est aussi parfaite que si l'on avait employé de l'antiformine.

CHAPITRE V

MÉTHODES UTILISANT DES PRODUITS DIVERS

Les techniques dont l'exposé va suivre ont recours à des produits si différents les uns des autres qu'on ne sait comment les classer.

A côté du chloroforme qui n'a pas ici d'action chimique, du phénol, de l'eau oxygénée et de l'alcool, produits d'usage courant, mais que leurs propriétés ne semblaient pas destiner à l'homogénéisation des crachats, on voit paraître, de façon assez inattendue, le mastic en larmes et la pyridine.

CHLOROFORME ET GRENAILLE DE PLOMB

Technique d'Aman, 1895 (82)

Voici un procédé tout mécanique : 10 cm³ environ de crachats et 40 cm³ d'eau sont agités dans un tube cylindrique avec quelques grains de plomb et 10 cm³ de chloroforme. Le chloroforme joue en l'espèce, seulement le rôle de collecteur. A sa surface, se forme bientôt une abondante couche viqueuse dans laquelle tous les éléments cellulaires sont intacts, on la prélève et on l'étale.

ACIDE PHÉNIQUE

Technique de Van Ketel, 1892 (135). $D = 1.030$

Par ce procédé, on n'obtient pas une liquéfaction complète des crachats, mais une coagulation partielle.

A 10 cm³ de crachats, on ajoute 10 cm³ d'eau et 6 grammes de solution d'acide phénique à 91 %. Il se forme au fond du verre un dépôt blanc, très abondant, épais, visqueux, élastique, qui s'étend difficilement.

Technique de Th. Koch, 1919 (136). $D = 1.030$

TH. KOCH reprend en le modifiant le procédé de VAN KETEL. Comme lui, il emploie la solution d'acide phénique à 91 % et dans les mêmes proportions : 6 grammes pour 10 cm³ de crachats et 10 cm³ d'eau distillée.

Après avoir agité, on centrifuge, puis on jette le liquide surnageant, et l'on ajoute, goutte à goutte, au résidu, de la lessive de soude jusqu'à dissolution du culot de centrifugation. On étend avec de l'eau et l'on centrifuge à nouveau.

La dissolution du premier culot par la lessive de soude ne peut jamais être complète, il en faudrait ajouter une quantité trop grande.

Le deuxième culot de centrifugation est visqueux, abondant, difficile à étaler ; l'examen microscopique n'y révèle plus d'éléments cellulaires.

EAU OXYGÉNÉE

Technique de Sachs-Mücke, 1906 (162). $D = 1.002$

A un mélange de 6 à 7 cm³ de crachats et 15 cm³ d'eau distillée, ajouter 5 cm³ d'eau oxygénée à 12 volumes. Centrifuger après addition d'alcool à 90° (5 cm³ environ).

Le culot de centrifugation est abondant, encore visqueux et contient de nombreux éléments cellulaires intacts.

ALCOOL A 95°

Technique de d'Arrigo et Stampacchia, 1899 (83). D = 990

Un volume de crachats est agité avec deux volumes d'alcool à un tiers. Le mélange, après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, est centrifugé. Le culot de centrifugation est peu abondant, d'étalement facile, les Bacilles y sont en paquets et les éléments cellulaires encore nombreux.

PYRIDINE

Technique de M^{lle} Giraud et Darrien, 1916 (119). D = 1.020

On agite 4 volumes de crachats avec 3 volumes de pyridine, on laisse en contact jusqu'à fluidification (10 à 15 minutes, disent les auteurs), et l'on centrifuge.

Le mélange se fait à froid dans un flacon de verre bouché. La fluidification est beaucoup plus lente que ne l'indiquent les auteurs et demande parfois plusieurs heures. Une mousse épaisse se forme qui s'attache aux parois du flacon et flotte sur le liquide.

Le culot de centrifugation est épais, il a la consistance d'une gelée; très élastique, il est difficile à étaler et prend mal les colorations.

MASTIC EN LARMES

Technique de Robert Pfeiffer et Walter Robistchek, 1922 (155)

D = 1.002

L'addition à 20 cm³ d'eau, de 5 cm³ de solution de mastic en larmes, à 10 %, dans l'alcool absolu, détermine une émulsion de mastic, une solution colloïdale ; c'est le fluidifiant proposé par PFEIFFER et ROBISTCHEK pour homogénéiser les crachats.

On dissocie mécaniquement par des perles de verre 50 cm³ de crachats étendus de 150 cm³ d'eau ; on prélève 8 cm³ de ce liquide ;

à ces 8 cm³, on ajoute 2 cm³ de fluidifiant au mastic. Ce mélange est centrifugé après un séjour de 24 heures à l'étuve.

Le culot obtenu est blanc, abondant, visqueux, élastique, très difficile à étaler ; tous les éléments cellulaires y sont conservés.

Ce culot de centrifugation, relativement volumineux, ne peut être complètement étalé : il est prudent de faire trois prélèvements à trois niveaux différents : à la surface, au milieu et au fond.

Ce procédé que rien ne justifie au point de vue théorique est à abandonner pour ses mauvais résultats pratiques.

CHAPITRE VI

MÉTHODES DE DIGESTION ARTIFICIELLE

Les crachats sont composés de matières albuminoïdes et de matières grasses. L'idée de les liquéfier à l'aide de ferments digestifs devait donc venir tout naturellement à l'esprit.

PANCRÉATINE

Technique de Spengler, 1895 (167). $D = 1.020$

Les crachats, 10 cm³ environ, sont dilués dans une quantité égale d'eau distillée et agités. On ajoute, quand ils sont désagregés, quelques gouttes de lessive de soude, de sorte que l'ensemble du mélange contienne environ 0 gr. 10 de soude pour 100. On opère dans un verre conique.

On délaie à part, dans l'eau distillée tiède, 1 gramme de pancréatine qu'on ajoute au mélange. Le vase, couvert d'une boîte de Petri, est mis à l'étuve à 37° C. Au bout de 2 à 3 heures, les crachats sont en partie liquéfiés. On leur ajoute alors de 0 gr. 10 à 1 gramme d'acide phénique cristallisé qui se dissout. On laisse encore 10 à 15 heures à l'étuve.

On procède ensuite à la collection et à l'étalement du dépôt, opérations délicates, car le sédiment est visqueux, élastique et peu adhérent à la lame.

Technique de Paulus, 1895 (154). $D = 1.010$.

Avec cette technique, on opère encore dans un verre conique.

Aux crachats, désagregés et dilués dans l'eau distillée, on ajoute

quelques gouttes d'une solution concentrée de carbonate de soude et une pincée de pancréatine.

Après 15 à 18 heures de séjour à l'étuve, on recueille le dépôt grisâtre, peu abondant, qui est au fond du verre et on l'étale, il s'étend facilement mais adhère mal à la lame. Au microscope, on ne trouve plus d'éléments cellulaires.

« SUC GASTRIQUE » FLUORÉ

Technique du Docteur A. Jousset, 1903 (132-133). D = 1.006

JOUSSET a recommandé, tout d'abord, son « *suc gastrique fluoré* » pour la recherche des Bacilles tuberculeux dans le sang et le caillot fibrineux qui se forme dans le liquide pleural ; mais on peut aussi l'utiliser comme dissolvant des albuminoïdes contenus dans les crachats.

Voici la formule de ce « *suc gastrique* ».

Pepsine en paillettes, titre 50.....	1 gr. 50
Glycérine pure	} aa 10 cm°
Acide chlorhydrique 22° B.....	
Fluorure de sodium	3 gr.
Eau distillée, Q S. pour.....	1.000 gr.

Ce liquide doit être de préparation récente.

On mélange 30 cm³ de « suc » de Jousset à 10 cm³ de crachats dans un flacon bouchant à l'émeri. La liquéfaction est complète après un séjour de 2 à 3 heures à 37° C. Pendant ce temps, le mélange a été agité toutes les demi-heures.

On centrifuge ; le culot est minime et s'étale bien, tous les éléments cellulaires sont parfaitement détruits.

BILE

La bile de Bœuf utilisée en vue de la fluidification des crachats doit être stérilisée.

Les auteurs qui l'emploient ne donnent pas d'indications sur la préparation de la bile stérilisée ; j'ai suivi celles du Professeur CALMETTE relatives à la préparation des milieux de culture biliés (101) :

Verser dans un ballon le contenu d'une ou de plusieurs vésicules biliaires que l'on vide, après les avoir fendues à la partie supérieure. Stériliser à 120°, conserver trois semaines. Il se forme un dépôt abondant. Décanter et filtrer sur papier. Répartir alors dans de gros tubes de verre bouchés au coton, puis stériliser à nouveau à 120°.

Bile iodée.

Technique de Grysez et Bernard, 1920 (123). $D = 1.002$

GRYSEZ et BERNARD ajoutent à la bile de la teinture d'iode dans la proportion de 2 gouttes de teinture d'iode par centimètre cube de bile.

Les crachats sont triturés dans un verre conique avec 10 fois leur volume de bile iodée. Ils sont soumis ensuite à l'action de la chaleur. Les auteurs exposent quatre modes différents de chauffage :

18 heures à 37° ;

3 heures au bain-marie à 56° ;

Un quart d'heure au bain-marie à 100° ;

Quelques minutes à l'ébullition.

Je préfère le séjour à l'étuve à 37°.

Quel que soit le mode de contact, il se forme un dépôt, brun si le contact a été insuffisant, grisâtre, minime, si l'attaque a été suffisante.

On ajoute au liquide d'homogénéisation un tiers de son volume d'eau salée saturée pour élever la densité, on agite. On répartit le nouveau mélange dans des tubes à centrifuger, et après avoir ajouté dans chacun 2 à 3 cm³ d'éther, on centrifuge.

Il se forme, entre la bile et l'éther, une pellicule grisâtre que l'on prélève, non sans difficulté, et que l'on étale : elle adhère mal à la lame.

GRYSEZ et BERNARD recommandent, après fixation par l'alcool absolu, la coloration par la fuchsine phéniquée, mais avec décoloration par l'alcool acétique à un tiers. Les résultats ne sont pas différents lorsqu'on suit exactement la technique de ZIEHL-NEELSEN.

Bile pure.

Technique d'Hirtzmann, 1921 (127). $D = 1.000$

Simplification de la méthode précédente : la bile est ici employée pure et au lieu d'une pellicule superficielle, on recueille un culot de centrifugation.

Les proportions sont les mêmes que dans le procédé de GRYSEZ et BERNARD : 10 fois plus de bile que de crachats.

On verse les crachats dans un tube sur la bile, on agite, puis on porte à l'ébullition ou mieux, on laisse 12 heures à l'étuve à 56°. Au bout de ce temps, le liquide est clair, au fond se trouve un léger dépôt grisâtre. On centrifuge après addition d'alcool à 95°. Le culot est minime, grisâtre, s'étale très facilement, mais adhère mal à la lame.

On colore par les méthodes ordinaires.

CHAPITRE VII

MÉTHODES DE « LYSE » DES CRACHATS

Des crachats abandonnés à eux-mêmes se liquéfient ; leur liquéfaction peut être hâtée par l'action de la chaleur douce, un séjour à l'étuve à 37° par exemple. Ils se liquéfient en subissant la putréfaction.

Malgré l'apparente spontanéité de cette décomposition, l'expression « *autolyse* » de plus en plus employée est-elle un terme propre et précis ? En effet, deux phénomènes contribuent à la désagrégation des crachats, se superposent :

1° La « *lyse* » des crachats par les ferments solubles qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme ;

1° La « *protéolyse* » par les Bactéries sécrétant des ferments protéolytiques.

Ce dernier phénomène est peut-être plus important que le premier.

Je préfère donc recourir à un néologisme et dire au lieu « *d'autolyse* », « *lyse* » des crachats.

LYSE OBTENUE A LA TEMPÉRATURE ORDINAIRE

Technique de Sabrazès, 1903 et 1922 (161).

Favre et Devuns, 1921 (115).

SABRAZÈS avait, dès 1903, appelé l'attention sur la fluidification « *spontanée* » des crachats abandonnés à eux-mêmes et le parti

qu'on en pourrait tirer. FAVRE et DEVUNS la proposent comme un moyen de concentration des Bacilles tuberculeux.

Les crachats sont laissés dans un flacon bien bouché à la température du laboratoire. Au bout de 6 jours environ, ils sont partagés en deux couches, l'une inférieure solide, l'autre supérieure liquide.

La couche inférieure perd peu à peu sa consistance visqueuse pour devenir granuleuse. Si on en prélève alors des parcelles, qui d'ailleurs s'étalent bien, on constate, avec un enrichissement en Bacilles tuberculeux qui semble atteindre son maximum vers le dixième jour, l'enrichissement en germes microbiens.

LYSE A TEMPÉRATURE ORDINAIRE AVEC ADDITION DE GLYCÉRINE

Technique de Korbsch, 1922.

Cette méthode a été citée et employée par STEICH et PIETSCH (168).

Les crachats enfermés dans une boîte de PETRI reposent sous une couche d'une solution de glycérine à 4 %, pendant plusieurs jours, à la température du laboratoire. On ne constate de liquéfaction qu'au bout d'une semaine. Alors, de verts ou jaunes qu'ils étaient, ils sont devenus grisâtres. On les agite et on en prélève une parcelle.

Avec une augmentation du nombre des Bacilles tuberculeux mis en évidence, on peut constater également l'augmentation du nombre des germes microbiens, et parfois aussi le développement de champignons divers.

LYSE HATÉE PAR LA CHALEUR

Technique de Philipp, 1886 (156), Bezançon, Mathieu et Philibert, 1922 (90). 37° C.

Un tube à essai contenant les crachats est laissé en repos à l'étuve. Au quatrième jour, les crachats qui ont alors une odeur putride sont complètement liquéfiés.

Au fond du tube est un léger dépôt granuleux que l'on prélève après décantation. On peut encore après disparition de la partie supérieure du liquide, centrifuger la partie inférieure.

Le dépôt granuleux s'étale facilement, mais adhère mal au porte-objet.

Technique de Bezançon, Mathieu et Philibert, 1922 (91) 50° C.

La liquéfaction des crachats est suffisante au bout de 24 heures ; elle donne les mêmes résultats que si l'on opère à 37°, mais les crachats ne présentent pas, comme dans le cas précédent, d'odeur de putréfaction.

Les éléments cellulaires sont encore assez nombreux et les préparations adhèrent mal à la lame.

*Technique de Bezançon, Mathieu et Philibert, modifiée
par Caussade et M^{me} Cribier, 1923 (103). 37° C.*

On peut ajouter aux crachats, avant de les mettre à l'étuve à 37° de la glycérine à raison de 10 gouttes pour 10 cm³ de crachats.

Les résultats sont les mêmes qu'en l'absence de glycérine et l'adhérence à la lame est encore diminuée.

CHAPITRE VIII

TRANSFORMATION DES CRACHATS A TEMPÉRATURE ÉLEVÉE

Ici moins encore que dans les cas précédents, on ne peut, à mon avis, parler d'autolyse, terme adopté cependant par les auteurs eux-mêmes. Ce que j'appelle « lyse » ne peut même se produire, car à température élevée, l'action des ferments et des Bactéries est impossible.

Technique de Despeignes, 1921 (109) Autoclave à 120°

La technique suivie est fort simple.

On stérilise les crachats placés dans un récipient fermé, par un séjour de 20 minutes à l'autoclave à 120°. L'auteur recommande de tenir les crachats dans une boîte de PETRI fermée. Je préfère employer un flacon de verre que je bouche avec plusieurs épaisseurs de papier-filtre.

Après stérilisation, on prélève et on étale directement les grumeaux qui flottent dans un liquide grisâtre. On peut aussi centrifuger.

Si l'on procède, comme je fais, dans un flacon bouché de papier-filtre, il ne reste le plus souvent aucun liquide ; le prélèvement des grumeaux restant au fond du flacon ou attachés à ses parois n'en est que plus facile.

Ce dépôt granuleux qui s'étale très bien, adhère généralement bien à la lame. L'examen microscopique y révèle de nombreux éléments cellulaires.

Despeignes recommande la coloration par la liqueur de ZIEHL,

suivie d'une décoloration par l'alcool absolu contenant 2 % d'acide lactique. Je ne trouve à ce décolorant aucun avantage sur l'acide nitrique au tiers de la technique habituelle de ZIEHL.

Technique de Bezançon, Mathieu et Philibert, 1922 (91). 70° C.

J'ai, comme ces auteurs, essayé l'effet sur les crachats d'une température de 70° C.

Par ce procédé, les crachats se coagulent en masse en 24 heures. Le coagulum flotte dans le liquide, il est assez considérable et ne peut être étalé complètement.

CHAPITRE IX

PROCÉDÉS MIXTES

ACTION DE LA CHALEUR ET PRÉCIPITATION DE LA MUCINE

Technique de Hempel, 1902 (126). $D = 1.008$

Deux phases dans cette méthode :

1° Maintenir les crachats à 60° jusqu'à désagrégation ;

2° Ajouter à 10 cm³ de crachats désagregés 1 cm³ de H Cl à 10 % et 1 cm³ de réactif de BRUCKE. Laisser déposer.

Cette méthode ne convient qu'aux crachats peu épais, spumeux, muqueux, muco-purulents.

Le réactif de BRUCKE est un réactif des albuminoïdes, sa formule :

Iodure de potassium	10 gr.
Bichlorure de mercure	2 gr. 71
Eau distillée, q. s. pour.....	200 cm ³

Par centrifugation on obtient un culot abondant, blanc, visqueux, élastique, s'étalant mal.

LIQUÉFACTION ET PRÉCIPITATION

Technique de Bierry, 1916 (97-98). $D = 1.004$

On dilue les crachats dans de l'eau distillée : deux fois leur volume s'ils sont peu épais, et jusqu'à cinq fois leur volume s'ils sont nummulaires ; on ajoute une goutte d'eau de Javel par centimètre cube de crachats et l'on soumet à 37°. Pendant ce

chauffage, on verse peu à peu une solution de soude à 1 % (6 à 8 gouttes par centimètre cube de crachats).

Dans un mélange de quatre parties du liquide d'homogénéisation et une partie d'eau distillée, on verse encore, goutte à goutte, de l'acide acétique jusqu'à réaction acide au tournesol. Un léger précipité se forme que l'on condense par centrifugation et l'on étale le culot. Enfin, au liquide décanté on ajoute une nouvelle dose (1/50) d'acide acétique, on centrifuge et l'on étale le nouveau culot. C'est, en somme, le traitement du sous-produit, si l'on peut ainsi dire.

Les deux culots obtenus, minimes, granuleux, s'étalent facilement et ne contiennent plus d'éléments cellulaires.

LIQUÉFACTION ET PRÉCIPITATION CHIMIQUE

Technique de Fritz Dithorn et Werner Schultz, 1917

D = 1.004 (112).

Déterminer dans les crachats liquéfiés un précipité chimique susceptible d'englober les Bacilles tuberculeux est certes, un moyen ingénieux de les collecter. C'est ainsi que DITTHORN et SCHULTZ précipitent de l'hydrate de fer dans le liquide d'homogénéisation.

Les crachats dilués dans leur volume d'eau distillée, puis additionnés de 10 % de potasse caustique à 15 %, sont tenus au bain-marie à 50° jusqu'à liquéfaction parfaite.

Verser alors sur 30 cm³ de crachats liquéfiés, 2cm³ de solution de perchlorure de fer à 2 %. Des flocons d'hydrate de fer apparaissent, diffus, légers, couleur de rouille, que l'on recueille difficilement. Les auteurs ne conseillent pas la centrifugation, mais je l'emploie. Le culot obtenu est peu abondant, s'étale bien et donne des préparations brunes suffisamment adhérentes à la lame.

Colorer par la liqueur de ZIEHL, mais décolorer par l'acide chlorhydrique, sans employer de colorant de contraste.

J'ai expérimenté cette méthode de nombreuses fois pour n'obtenir le plus souvent qu'une préparation uniformément brune, totalement

illisible ; parfois, mais rarement, une préparation dans laquelle on distinguait avec peine les Bacilles ; jamais de préparation où ils se manifestaient nettement.

Technique de Schmitz et Kurt Brauer, 1913 (99-163). D = 1.008.

Voici l'opération essentielle : des crachats délayés dans l'eau additionnée de quelques gouttes d'ammoniaque sont chauffés au bain-marie à 50° pendant 15 à 20 minutes. On ajoute, à 10 cm³ de mélange 0 cm³ 5 de solution de sulfate d'aluminium à 10 % et l'on agite. On obtient un précipité blanc, abondant, d'alumine gélatineuse. Les auteurs proposent deux procédés différents pour sa collection :

1° Dix minutes de centrifugation. Le culot blanc et gélatineux ne peut être recueilli que par fragments, il est nécessaire, pour avoir des préparations minces, d'opérer de la façon suivante : faire l'étalement sur une lame avec une autre lame, on a ainsi deux préparations. L'examen microscopique révèle encore des éléments cellulaires ;

2° Aux 10 cm³ du mélange, on ajoute 1 cm³ d'alcool-chloroforme à parties égales, on agite et l'on centrifuge.

Au fond du tube à centrifuger on retrouve le chloroforme, au-dessus, le précipité abondant d'alumine, et plus haut, l'eau et l'alcool. On prend la couche intermédiaire.

BRAUER (99) a proposé de simplifier ainsi sa méthode :

Traiter les crachats à l'ébullition dans un tube à essai sans recourir à la centrifugation. J'utilise un tube à essai quand je ne dispose que d'une quantité réduite de crachats. Mais, quand la quantité de crachats à homogénéiser est égale ou même supérieure à 10 cm³, j'opère la liquéfaction dans un matras cylindrique haut. Je le maintiens sur la platine chauffante à une température de 70° environ, pendant dix minutes, en remuant à l'agitateur. J'ajoute ensuite une solution de sulfate d'aluminium à 10 % — 1 goutte pour 1 cm³ du liquide — et je porte à l'ébullition.

Le précipité gélatineux d'alumine s'amasse en un disque très épais à la partie supérieure du récipient. Ce disque est prélevé et étalé. A cause de son volume, il ne peut être étalé en entier.

COAGULATION SUIVIE DE LIQUÉFACTION

Technique de Gorescu, 1922 (121). $D = 1.008$

On opère sur 100 grammes environ de crachats en présence de 2 % d'acide acétique et de quelques perles de verre. On dissocie les crachats en les agitant pendant 20 minutes dans un flacon bouché à l'émeri, puis on filtre à travers une gaze qui retient les perles et les débris alimentaires s'il y a lieu. Le filtrat est mis au bain-marie à 58°.

Après 15 à 30 minutes de séjour à 58°, on sépare de la partie liquide, par centrifugation, le coagulum de mucine : il est assez considérable. Lavé une ou deux fois à l'eau distillée, ce coagulum est ensuite repris avec deux ou trois fois son volume d'eau distillée, et énergiquement agité pour mettre la mucine en suspension. On verse quelques gouttes de solution de soude caustique à 3 % jusqu'à réaction nettement alcaline. On porte à l'ébullition. On filtre et l'on centrifuge le liquide filtré. Après avoir lavé une ou deux fois à l'eau distillée le culot infime obtenu, pour le débarrasser de l'excès de soude, on l'étale.

Les préparations présentent les caractères de celles que donne l'homogénéisation par la soude.

M'inspirant de la technique de GORESCU et pour les raisons que j'expose ici, j'ai fait quelques

Tentatives d'obtention d'un culot de centrifugation unique et réduit au minimum à partir d'un volume important de crachats

C'est souvent lorsque l'on a affaire à des malades qui expectorent très abondamment, que plusieurs examens microscopiques successifs restent négatifs. Il est nécessaire alors de concentrer la plus grande quantité possible de crachats, au moins 100 grammes. J'ai procédé comme suit :

1° Je coagule, pour en éliminer l'eau, des crachats au bain-marie à 50° en présence d'acide acétique (1 goutte par 3 cm³ de crachats);

2° Je recueille le coagulum très épais et visqueux ainsi obtenu, non par centrifugation, mais par filtration à la trompe à eau.

Sur le premier fond plat et criblé de petits trous d'un entonnoir de porcelaine de BUCHNER, est disposé un disque très ajusté de papier-filtre. Sur ce papier est coulé jusqu'à épaisseur de 0^m005 du plâtre de Paris gâché très clair (noyé, pour emprunter un terme de métier). Séché, ce disque de plâtre d'un demi-centimètre d'épaisseur adhère aux parois circulaires de l'entonnoir, sa surface est dure, lisse et brillante. Tel est mon filtre ¹.

Il est fixé par un bouchon de caoutchouc sur la fiole conique spéciale. La filtration est complète en 5 minutes.

Le coagulum abondant s'attache à la surface du disque de plâtre où je le recueille. Il est alors homogénéisé avec seulement son poids d'eau distillée et autant de gouttes de lessive de soude que de grammes d'eau. Puis le liquide d'homogénéisation est centrifugé.

Le poids du premier coagulum est en moyenne 1/6 ou 1/8 du poids initial des crachats et le poids du culot final 1/150 du poids des crachats.

J'ai pu ainsi examiner, dans un résidu minime tous les Bacilles d'un volume important (100 grammes au moins) de crachats.

Lorsqu'on suit la méthode de BEZANÇON et PHILIBERT, on doit, pour centrifuger tout le liquide correspondant à seulement 10 cm³ de crachats, employer plusieurs tubes. Si l'on opère comme je viens de l'indiquer, un seul tube suffit à la centrifugation du liquide d'homogénéisation d'un volume de crachats au moins dix fois plus grand que celui qui est utilisé dans la méthode de BEZANÇON et PHILIBERT.

¹ La filtration au papier est trop lente. La filtration à la trompe sur amiante, aussi bien que sur filtre de porcelaine muni d'une rondelle de papier *Chardin* est rendue à peu près impossible par l'excessive viscosité du coagulum. Il en est de même si l'on essaie de pratiquer l'aspiration de l'eau à travers une bougie : les parois de la bougie sont vite enduites de fragments de coagulum qui arrêtent la filtration.

HOMOGÉNÉISATION DES PRODUITS DE « LYSE » DES CRACHATS A 37° C.

Technique de Besançon, Mathieu et Philibert, 1922 (90).

$$D = 0.999$$

BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT recommandent, si l'autolyse ne donne pas de résultats satisfaisants, l'homogénéisation des crachats autolysés.

On homogénéise le résidu par la soude selon la technique habituelle de ces auteurs. On obtient ainsi un culot infime.

HOMOGÉNÉISATION PAR LA SOUDE, APRÈS SÉJOUR A L'AUTOCLAVE A 120°

Technique de Renaux, 1921 (158). $D = 1.004$.

Dans la technique de RENAUX, on porte les crachats (1 à 2 cm³) à 120° dans l'autoclave pendant 3 minutes. On les laisse refroidir et l'on centrifuge.

On ajoute ensuite au culot 10 à 20 fois son volume de soude à 5 %. L'on porte à l'ébullition dans un bain-marie en agitant jusqu'à la liquéfaction complète qui se produit au bout de 5 à 10 minutes. On centrifuge à nouveau, le liquide étant encore chaud. L'on étale le culot très minime que l'on colore par la méthode de ZIEHL sans contre-colorer au bleu.

Telle est la technique proposée.

Les préparations qu'elle donne ne contiennent que les Bacilles tuberculeux. Je préfère user d'une coloration de contraste au bleu de méthylène : les Bacilles se détachent, à mon avis, beaucoup mieux sur un fond granuleux légèrement bleuté, que sur fond blanc.

L'auteur ne fait porter ses investigations que sur 1 ou 2 cm³ de crachats. J'estime cette quantité insuffisante pour la rigueur des résultats, et j'opère sur la totalité des crachats dont je dispose.

CHAPITRE X

CRITIQUE DES MÉTHODES DE CONCENTRATION

L'étude critique des méthodes de concentration du Bacille tuberculeux dans les crachats a fait l'objet de nombreuses recherches. Mais le plus souvent, les auteurs ont limité leurs investigations à deux, trois, quatre techniques, une dizaine au plus. Les résultats obtenus sont de plus contradictoires et ne laissent pas de déconcerter un peu.

En poursuivant les essais méthodiquement, on obtient souvent des résultats différents avec une même technique. Quand je n'obtins rien de certaines méthodes considérées par d'autres comme bonnes, je multipliai avec ténacité mes essais et j'ai dû finalement reconnaître qu'entre mes mains, ces techniques ne donnaient rien. J'ai obtenu des résultats satisfaisants avec des techniques peu estimées ou même complètement abandonnées.

HOMOGÉNÉISATION SUR LAME

Avant tout, j'indiquerai que je ne puis considérer comme recommandables les techniques d'enrichissement par homogénéisation sur lame (DISTASO, FAISCA). Elles augmentent certes dans de grandes proportions le nombre des Bacilles tuberculeux mis en évidence ; mais comme la quantité de crachats examinée est à peine supérieure à celle que l'on étale en vue de l'examen microscopique direct, les inconvénients sont les mêmes : on risque de prélever

pour examen une parcelle non bacillifère, alors que le reste des crachats contient des Bacilles.

Ne présentent, à mon avis, quelque intérêt que les techniques seules qui permettent de traiter une quantité de crachats notablement plus grande (au moins 5 cm³) que celle qui fait l'objet d'un examen microscopique direct.

Parmi ces techniques, celles qui aboutissent à l'étalement d'un culot ou d'un sédiment m'ont paru bien supérieures à celles qui utilisent un liquide léger entraînant les Bacilles pour les grouper ensuite entre la partie aqueuse et le liquide collecteur.

COLLECTION A LA SURFACE

Dans ces cas, la couche à prélever n'est souvent qu'une fine pellicule ; dès qu'on tente de l'enrouler autour de la spatule ou de l'anse de platine pour l'enlever, on la déchire, on la dilue en partie et l'on ne dépose qu'un résidu solide infime qui s'étale mal sur la lame où il ne doit occuper que la plus petite surface possible.

Si l'on collecte par la ligroïne (HASERODT, JACOBSON, BERNHARDT), les préparations ne restent pas sur les lames. Je n'ai pu obtenir une seule préparation à l'aide de l'une quelconque de ces trois techniques et cependant mes essais furent nombreux. Malgré le lavage préalable des lames à l'acide chlorhydrique, leur séjour, après étalement, 24 heures, 48 heures et même davantage à l'étuve, les préparations se sont toujours détachées au cours de la coloration.

En associant l'éther à la ligroïne (GUY LAROCHE et VIRMEAUX) ou en collectant à l'alcool-acétone (KOSLOW, ALLÈGRE, RONCHÈSE), on obtient des préparations de faible adhérence. Les préparations sont très adhérentes quand le collecteur est l'éther pur (DARBÈS, GRYSEZ et BERNARD) ou l'alcool-éther (COURATTE-ARNAUDE).

En général, en ne considérant évidemment que les techniques dont le fluidifiant éprouvé donne de bons résultats (GUY LAROCHE et VIRMEAUX, COURATTE-ARNAUDE, RONCHÈSE, ALLÈGRE, KOSLOW), je n'ai pu trouver à cause du mode de collection aucun enrichisse-

ment. Pourtant, si en employant les mêmes fluidifiants on avait centrifugé et examiné le culot au lieu d'avoir recours à un liquide collecteur, on aurait constaté un enrichissement notable en Bacilles tuberculeux. Seule la technique à l'eau de Javel, de DARBÈS fait exception.

Si l'on collecte par le chloroforme, on a, non plus une simple pellicule, mais une pastille épaisse à prélever, et pourtant avec la technique de FOUREST et celle de LÖEFFLER, je n'ai pas pu constater d'augmentation du nombre des Bacilles mis en évidence.

Je n'ai pas obtenu de meilleurs résultats avec la technique d'AMAN dont le principe repose sur la dissociation mécanique des crachats.

La technique de GUELMÉ et HOUAL, utilisant les propriétés dissolvantes de l'éther, semble voisine des précédentes techniques de collection à la surface. Pourtant elle est très différente de ces techniques, quoiqu'elle comporte un épuisement par l'éther dans une ampoule à décantation.

En effet, elle aboutit après évaporation de l'éther, à la collection d'un dépôt. Elle permet d'obtenir généralement une très grande augmentation du nombre des Bacilles mis en évidence.

COLLECTION D'UN CULOT DE CENTRIFUGATION OU D'UN SÉDIMENT

Les techniques qui recourent, soit à la centrifugation, soit à la sédimentation, ne déterminent pas toutes l'enrichissement des crachats en Bacilles tuberculeux. Cet enrichissement dépend surtout du traitement antérieur.

Alcalins.

Lessive
de soude.

Les techniques utilisant la lessive de soude m'ont donné, en général, de bons résultats.

La plupart de ces techniques n'emploient que la lessive de soude seule diluée. Certaines comportent l'addition d'un acide, aux cra-

chats fluidifiés pour neutraliser l'alcalinité. (CZAPLEWSKI, BEITZKE, SOPAKAR). Je n'ai pas trouvé à ces dernières de supériorité sur les autres.

C'est avec les techniques de BIEDERT et de BEZANÇON et PHILIBERT que j'ai obtenu l'augmentation la plus marquante des Bacilles mis en évidence. La technique de BEZANÇON et PHILIBERT modifiée par GAUSSEL et CORONE m'a permis plusieurs fois de déceler des Bacilles dans des crachats dont l'examen microscopique direct avait été négatif. Mais les manipulations en sont encore longues : il faut agiter constamment pendant 10 minutes au cours du chauffage, puis attendre que le liquide soit refroidi pour centrifuger. Il est, en outre, nécessaire pour centrifuger tout le liquide, d'utiliser plusieurs tubes. On a donc, après une centrifugation longue, — de trois quarts d'heure à 1 heure — plusieurs dépôts à étaler et à examiner.

Par la technique de RONCHÈSE à l'alcool sodé avec collection du culot de centrifugation, on obtient une augmentation aussi importante du nombre des Bacilles qu'avec les techniques qui précèdent.

La double méthode d'ELLERMANN et ERLANDSEN donne de meilleurs résultats. Cette méthode comporte des manipulations plus longues que celles que je viens d'envisager, mais présente l'avantage de ne donner qu'un culot extrêmement réduit.

J'ai utilisé cette propriété à diverses reprises pour des essais de numération des Bacilles tuberculeux dans les crachats d'un même malade dont l'expectoration était peu abondante¹. Le minime résidu recueilli après homogénéisation par la technique de ELLERMANN et ERLANDSEN était uniformément étalé sur une lame divisée au diamant en carrés de 0^m005 de côté, en une préparation très fine et régulière. Après coloration par la technique classique de ZIEHL, je comptais les Bacilles contenus dans plusieurs carrés pour en déduire le nombre total des Bacilles de la préparation, soit celui des Bacilles expectorés en 24 heures. Les nombres n'étaient, évidemment, que très approximatifs.

Par la technique de HAMMERL, à la soude et à l'ammoniaque,

¹ Elle variait de 0 gr. 90 à 2 grammes.

j'obtins, la première fois que j'en fis usage, un enrichissement considérable, surprenant : les Bacilles en amas couvraient littéralement chaque champ, tandis que l'examen microscopique direct n'en avait révélé qu'en petite quantité et tous disséminés. Mes essais ultérieurs accusèrent un enrichissement beaucoup plus faible. L'augmentation du nombre des Bacilles mis en évidence fut du même ordre que celle que fournit généralement la technique de BEZANÇON et PHILIBERT.

La technique de HAMMERL m'a permis de trouver une fois des Bacilles dans des crachats dont l'examen microscopique direct avait été négatif.

hypochlorites Quand on fluidifie les crachats par un hypochlorite, les manipulations sont plus simples que lorsqu'on a recours à la soude ; un traitement à froid est le plus souvent suffisant et le temps de centrifugation est sensiblement abrégé.

Parmi les techniques aux hypochlorites, la plus ancienne, celle de de LANNOISE et GIRARD, à l'eau de Javel et à la soude, qui nécessite deux centrifugations, et la plus récente, celle de PAPACOSTAS et GATÉ donnent, l'une et l'autre, une augmentation très appréciable du nombre des Bacilles mis en évidence.

D'ailleurs, en général, j'ai constaté, en suivant les diverses techniques à base d'antiformine un enrichissement net. Les lavages du culot, soit par l'eau distillée, soit par l'eau physiologique, qui compliquent parfois les manipulations (CALMETTE, HUNE deuxième procédé, LORENZ, PATERSON) sont, à mon avis, inutiles : l'adhérence des préparations n'en est pas sensiblement augmentée.

J'ai constaté l'enrichissement le plus notable par la technique de LORENZ et par celle de CORDONNIER. La dernière méthode a sur la première l'avantage d'être plus simple et plus rapide.

Les techniques à l'eau de Javel et à l'antiformine fournissent des liquides d'homogénéisation de densité élevée (de 1.020 à 1.040) notablement supérieure à celle du Bacille tuberculeux (1.010). Elles risquent par conséquent de laisser une partie des Bacilles en suspension dans le liquide décanté.

Alcalins
divers. Les résultats auxquels je suis arrivée avec les techniques de KUHNE, de STRAUS au borax, de STROSCHEIN au borax et à l'acide

borique ont été décevants. L'enrichissement en Bacilles fut toujours nul.

Dois-je attribuer ces mauvais résultats à l'excès de la densité du liquide sur celle du Bacille tuberculeux que l'on se propose de précipiter ? Ou bien sont-ils la conséquence de la viscosité du mélange, quand la fluidification est imparfaite ?

L'examen microscopique des préparations obtenues par les techniques de SPHEL et NAKAO-ABE, bien que révélant des éléments histologiques inaltérés, décèle en même temps des Bacilles plus nombreux que l'examen microscopique direct.

Les résultats fournis par la méthode de DILG montrent combien la densité du liquide d'homogénéisation est importante : malgré la présence du chlorure de sodium qui élève cette densité en vue d'une collection des Bacilles à la surface, cette densité ($D = 1.112$ en moyenne) n'est pas assez forte. Au lieu d'une seule pellicule superficielle, j'ai obtenu le plus souvent, à la fois une pellicule et un culot ; parfois un culot seulement.

Néanmoins, j'ai toujours constaté une augmentation sensible des Bacilles tuberculeux dans le culot et dans la pellicule superficielle, même quand les deux existaient simultanément.

Agissant comme un hypochlorite, l'hypobromite de KHOURI permet d'obtenir les mêmes résultats, mais plus lentement. J'ai dû parfois laisser 20 heures dans l'étuve à 37° pour arriver à la liquéfaction parfaite de crachats épais.

Produits divers.

Les produits que j'ai groupés sous une rubrique unique : *Produits divers*, m'ont permis d'obtenir des résultats parfois inattendus.

A priori, je ne pensais pas que l'enrichissement des crachats tuberculeux pût être déterminé par l'addition d'acide phénique ou d'alcool, et j'ai dû constater que cet enrichissement est sensible dans l'un (d'ARRIGO et STAMPACCHIA) et l'autre cas (Van KETEL, Th. KOCH. Tandis que la technique de SACHS-MUCKE à l'eau oxygénée ne m'a jamais révélé plus de Bacilles que l'examen micros-

copique direct ; elle m'en a révélé certaines fois moins et d'autres fois même ne m'en a pas révélé du tout, alors que le crachat original en contenait.

Avec la pyridine (M^{lle} GIRAUD et DARRIEN) les manipulations sont longues et compliquées : le prélèvement, l'étalement et la coloration du culot et des flocons ne vont pas sans difficulté. Les résultats auxquels je suis arrivée ne m'ont donné que déception. L'observation des préparations, soit du culot de centrifugation, soit de la mousse ne m'a jamais révélé plus de Bacilles que l'examen microscopique direct ; il m'en a révélé parfois moins ; peut-être parce que, comme je l'ai exposé plus haut, les Bacilles ne sont pas tous colorés. Cette méthode ne paraît donc pas recommandable. D'ailleurs, je doute qu'il se trouve un seul expérimentateur pour la regretter : l'odeur de la pyridine est à ce point nauséabonde et sa manipulation répugnante, que même donnât-elle quelque résultat, cette méthode trouverait peu d'adeptes ; et je ne parle pas du prix assez élevé de ce produit.

Ainsi qu'il fallait s'y attendre, l'émulsion de mastic (ROBERT PFEIFFER et WALTER ROBITSHECK) n'a donné que de mauvais résultats.

Digestion artificielle.

Les procédés de digestion artificielle m'ont donné des résultats très variables.

Par la technique de PAULUS et par celle de SPENGLER, je n'ai pas observé d'enrichissement en Bacilles tuberculeux : les préparations adhèrent généralement mal à la lame, et dans la technique de PAULUS, les Bacilles sont souvent masqués par un nombre très grand de germes microbiens.

Le « *suc gastrique* » employé par JOUSSET, au contraire, donne un dépôt très minime, des préparations claires, dans lesquelles les Bacilles se révèlent beaucoup plus nombreux qu'à l'examen microscopique direct.

J'ai multiplié mes expériences d'homogénéisation par la bile de bœuf. Plus d'une fois, après avoir suivi la technique de GRYZEZ et

BERNARD, ou celle d'HIRTSMANN, je ne constatai aucun Bacille dans le réseau, alors que l'examen direct avait été positif. Avec la première de ces techniques, c'est à cette constatation déconcertante que je suis toujours arrivée. Elle n'offre, il est vrai, qu'une fine pellicule à collecter. Mais, avec la seconde, après bien des essais, je fus plus heureuse et pus enfin retrouver des Bacilles après homogénéisation et même quelquefois constater un enrichissement assez notable.

« Lyse » des crachats.

Une augmentation sensible du nombre des Bacilles m'a été donnée par les techniques de « lyse » des crachats.

Quand les crachats sont abandonnés à eux-mêmes, sans l'addition d'aucun produit (SABRAZÈS, FAVRE et DEVUNS) ou additionnés de glycérine (KORBSCH), ou laissés plusieurs jours à l'étuve à 37°, sans addition d'un produit (BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT) ou additionnés de glycérine (CAUSSADE et M^{me} CRIBIER), l'examen microscopique a révélé de plus nombreux Bacilles tuberculeux qu'il n'en avait révélé dans le frottis.

Y a-t-il une augmentation réelle des germes ? Une multiplication des Bacilles comme dans une culture ?

BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT (90), BERGERON et LETULLE (86) croient que l'augmentation n'est qu'apparente et due à la liquéfaction du milieu.

Par contre STEICH et PIETSCH prétendent que l'addition de glycérine aux crachats réalise un milieu favorable où le Bacille tuberculeux se multiplie comme il le fait dans les milieux nutritifs adaptés à ses exigences.

Quoi qu'il en soit, toutes ces techniques sont peu pratiques : elles sont longues, les crachats dégagent une odeur de putréfaction et de plus, l'examen des préparations colorées est entravé par la présence de germes microbiens très nombreux et souvent de champignons divers, ainsi que je l'ai déjà signalé.

A 50° l'enrichissement est généralement assez sensible et il n'y a pas putréfaction. A 50° il ne saurait être question de multiplication.

Transformation des crachats à température élevée.

Je n'ai jamais obtenu le moindre enrichissement en laissant les crachats à 70°, tandis qu'en les soumettant, comme DESPEIGNES, 20 minutes dans l'autoclave à une température de 120° j'ai, le plus souvent, constaté un enrichissement appréciable.

Comme la technique de DESPEIGNES est très simple (on peut stériliser les crachats en même temps que la verrerie) et qu'elle soustrait l'expérimentateur aux dangers de la contamination, je l'ai plus particulièrement étudiée.

L'inocuité de la technique de DESPEIGNES est une caractéristique intéressante. Les autres techniques, en effet, surtout celles qui comportent une trituration des crachats en vase ouvert, et ce sont les plus nombreuses, ne sont pas sans danger pour l'opérateur.

Procédés mixtes.

Avec la technique de RENAUX (homogénéisation des crachats par la soude après séjour de quelques minutes à l'autoclave) j'ai toujours obtenu un très sensible enrichissement.

L'homogénéisation des produits de « Lyse » à l'étuve donne également de bons résultats, mais complique encore des techniques déjà longues, désagréables et peu pratiques.

En suivant les techniques d'HEMPEL, BIERRY et GORESCU, je n'ai jamais trouvé que le nombre des Bacilles tuberculeux fût augmenté, souvent il était moindre qu'à l'examen microscopique direct, parfois même aucun Bacille ne pouvait être décelé. Tandis qu'en utilisant les mêmes produits, mais par des procédés différents, que j'ai exposés au cours d'un précédent chapitre, j'ai obtenu, après des manipulations, longues certes, peu pratiques, et que d'ailleurs pour cette raison, je n'ose pas recommander, un enrichissement généralement fort appréciable.

Les techniques DITTHORN-SCHULTZ et SCHMITZ-BRAUER, bien que très voisines, m'ont donné des résultats très différents.

Avec la première, après l'étalement du précipité, collecté sans ou avec centrifugation, les préparations étaient difficilement colo-

rables, les Bacilles tuberculeux se détachaient mal sur le fond de la préparation et je n'ai jamais observé un nombre de germes supérieur à celui que m'avait révélé l'examen microscopique du frottis.

Avec la seconde méthode (SCHMITZ et K. BRAUER), j'ai observé un enrichissement important.

En résumé :

1° Dans des conditions expérimentales paraissant identiques, une même technique donne des résultats différents ;

2° Même avec les techniques qui déterminent toujours un enrichissement important des crachats en Bacilles tuberculeux, le nombre des Bacilles mis en évidence n'est pas augmenté dans un rapport constant.

Mes expériences ont porté presque uniquement sur des crachats qu'un examen préalable avait montrés bacillifères ; ainsi seulement, je pouvais reconnaître s'il y avait ou non augmentation des Bacilles mis en évidence. Or, le but des techniques de concentration étant de révéler des Bacilles quand l'examen microscopique du frottis a été négatif, quel fond solide peut-on établir sur des procédés qui aboutissent à des résultats aussi irréguliers lorsqu'on les applique à des crachats contenant sûrement des Bacilles ?

3° Je ne peux en définitive apprécier, pour chacune des techniques expérimentées, que l'enrichissement moyen. J'ai résumé mes recherches en trois tableaux dont les assertions n'ont rien d'absolu. Ces tableaux présentent synoptiquement et aussi fidèlement que possible une opinion impartiale basée sur de nombreuses expériences.

RÉSUMÉ DES RECHERCHES PERSONNELLES

TABEAU A : TECHNIQUES N'AYANT DONNÉ AUCUN ENRICHISSEMENT.

On a même observé parfois une diminution du nombre des Bacilles ou même l'examen après concentration fut négatif alors que l'examen microscopique direct était positif.

Quelques techniques à la soude.	{ FONTÈS. Lessive de soude et eau oxygénée. ALLÈGRE. Lessive de soude. Collection à la surface. RONCHÈSE. Alcool sodé. Technique sans centrifugation. (Collection à la surface.)
Toutes les techniques au borax et à l'acide borique.	{ KUHNE. Borax. Centrifugation. STRAUS. Borax. Sédimentation. STROSCHIN. Borax et acide borique. Centrifugation. THOMAS. Borax et acide borique. Collection à la surface.
Les techniques à l'antiformine avec collection à la surface.	{ HASERODT. JACOBSON. BERNHARDT. } Collection par la ligroïne. LÖFFLER. Collection par l'alcool-chloroforme. KOSLOW. Collection par l'acétone-éther.
Trois techniques de digestion artificielle.	{ PAULUS. SPENGLER. } Pancréatine. GRYZEZ et BERNARD. Bile. Collection à la surface.
Quelques techniques utilisant des produits divers.	{ AMAN. Homogénéisation mécanique. M ^{lle} GIRAUD et DERRIEN. Pyridine. PPEIFFER et W. ROBITSHECK. Emulsion de mastic. SACHS MUCKE. Eau oxygénée.

Une des techniques.	{ BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT. Coagulation à 70°.
Quelques procédés mixtes.	{ DITTHORN et SCHULTZ. Précipité d'hydrate de fer. GORESCU. Coagulation de la mucine et homogénéisation. BIERRY. Fluidification, puis précipitation. HEMPEL. Action de la chaleur et précipitation de la mucine.

TABLEAU B. — CLASSEMENT DES MÉTHODES DE CONCENTRATION AYANT DONNÉ LES MEILLEURS RÉSULTATS EN NE CONSIDÉRANT QUE L'ENRICHISSEMENT.

1. RENAUX. Homogénéisation par la soude après séjour dans l'autoclave, à 120°. Centrifugation.
2. DESPEIGNES. Séjour à l'autoclave, 20 minutes à 120°.
3. DISTASO { Homogénéisation sur lame.
FAISCA.
4. BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT. Homogénéisation du culot de « Lyse » à 37°.
5. JOUSSET. « *Suc gastrique* » fluoré.
6. CORDONNIER. « *Histohuol* ».
7. De ELLERMANN et ERLANDSEN. « *Doppelmethode* ».
8. Plusieurs méthodes à l'Antiformine : LORENZ, SEEMANN, PATERSON, Professeur CALMETTE, GUELMÉ et HOUAL.
KHOURI. Hypobromite.
9. SPEHL. Eau de chaux.
10. Plusieurs techniques à la soude. BEZANÇON et PHILIBERT, GAUSSEL et CORONE, BIEDERT.
RONCHÈSE. Alcool sodé. Technique par centrifugation.
11. HAMMERL. Lessive de soude et ammoniaque.
12. NAKAO-ABE. Sublimé et Na. Cl.
13. D'ARRIGO et STAMPACCHIA. Alcool.
14. BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT. « *Lyse* » à 37°.
KORBSCH. « *Lyse* » avec glycérine.
15. SCHMITZ et K. BRAUER. Sulfate d'aluminium.
16. TH. KOCH. { Acide phénique.
VAN KETEL.

TABLEAU C. — MÉTHODES QUI ONT DONNÉ LES MEILLEURS RÉSULTATS.
CLASSEMENT EFFECTUÉ EN TENANT COMPTE DE LEUR RENDEMENT, DE
LA SIMPLICITÉ ET DE LA RAPIDITÉ DES OPÉRATIONS.

1. SCHMITZ et K. BRAUER. Technique simplifiée, formation du précipité d'alumine à l'ébullition. Il ne peut s'étaler en entier. Tube à essai.
2. GUELMÉ et HOUAL. Antiformine à 40 %. Ampoule à décantation et verre de montre. Emploi alcool-éther (coûteux).
3. NAKAO-ABE. Sublimé et Na. Cl. à froid. Centrifugation.
4. CORDONNIER. « *Histoluol* » à froid. Centrifugation.
5. SPEHL. Eau de chaux. Action 1 à 2 heures à 56°. Centrifugation.
6. HAMMERL. Soude et ammoniacque. Centrifugation.
7. BEZANÇON et PHILIBERT. Technique modifiée par GAUSSEL et CORONE. Centrifugation.
8. DESPEIGNES. 20 minutes autoclave à 120°. Centrifugation.
9. Procédés à l'antiformine : LORENZ, HUNE, PATERSON. Centrifugation.
10. JOUSSET. « *Suc digestif* » fluoré, quelques heures de contact. Centrifugation.
11. DE ELLERMANN et ERLANDSEN. Carbonate de soude et soude, 24 heures de contact. Double centrifugation.
12. DE LANNOISE et GIRARD. Eau de Javel et soude. Double centrifugation.
13. TH. KOCH. Acide phénique 91 %. Double centrifugation.
14. RENAUX. Lessive de soude après autoclave. Centrifugation.

Pour opérer ce classement, j'aurais pu tenir compte de l'inocuité plus ou moins absolue des diverses méthodes, point très important, en même temps que de leur rendement, de la simplicité et de la rapidité des opérations. Je ne l'ai pas fait. *Mais je considère que toutes les méthodes comportant une trituration en vase ouvert sont condamnables, les autres dangereuses encore.* Seules les techniques de DESPEIGNES et de RENAUX soustraient l'opérateur aux risques de la contamination.

CHAPITRE XI

ÉTUDE DE LA TECHNIQUE DE DESPEIGNES

Très simple, nécessitant peu de manipulations, la technique de DESPEIGNES est assez séduisante parce qu'elle soustrait l'expérimentateur aux risques de la contamination.

DESPEIGNES conseille d'opérer de la façon suivante : Des crachats enfermés dans une boîte de PETRI sont maintenus dans l'autoclave, 20 minutes à une température de 120°. Après la stérilisation, on prélève des flocons qui flottent dans un liquide laiteux ; on les étale ; on peut centrifuger le liquide lui-même.

Je préfère employer, au lieu de boîte de PETRI, un flacon à large ouverture qui est recouvert de papier-filtre en double épaisseur, ficelé autour du goulot. Ce flacon est choisi d'une contenance telle, que le volume de crachats dont on dispose ne l'emplisse, au plus, qu'à moitié.

Souvent, après un séjour de 20 minutes à l'autoclave à 120°, le liquide est évaporé. Le flacon ne contient plus qu'une couche grisâtre, grumeleuse, adhérente aux parois. J'étale seulement les grumeaux du fond. L'expérience m'a démontré que dans les grumeaux du fond se sont concentrés les Bacilles tuberculeux.

Il m'est arrivé, parfois, quand du liquide restait, alors que les crachats originaux contenaient des Bacilles, de n'en retrouver aucun dans les flocons en suspension ou collés aux parois de verre. J'en découvrais toujours alors dans le culot de centrifugation et même avec un enrichissement notable.

J'en conclus qu'il est nécessaire, si le liquide a disparu par évapo-

ration, d'examiner le fond du vase et s'il reste du liquide de procéder à la centrifugation.

La colorabilité des crachats n'est, en aucune façon, altérée par le passage à l'autoclave. J'ai vérifié le fait en laissant à 120° pendant 20 et même 40 minutes des préparations sur lames non fixées et non colorées.

En comptant au réseau oculaire le nombre total de Bacilles par 500 carrés dans les mêmes crachats, sur des préparations traitées comme d'habitude ou soumises avant fixation à la température de 120° pendant 20 et 40 minutes, j'ai obtenu les résultats suivants :

Préparations non chauffées	
2 préparations :	37 Bacilles
	32 Bacilles
Préparations chauffées	Préparations chauffées
20 minutes à 120°	40 minutes à 120°
2 préparations :	2 préparations :
36 Bacilles	33 Bacilles
35 Bacilles	34 Bacilles

Restait à voir si les résultats peuvent différer quand les crachats sont directement soumis à la température de 120° ou quand ils sont munis d'un isolant. J'ai fait l'expérience suivante :

Trois flacons contenant des quantités égales d'un même crachat sont chauffés dans l'autoclave 20 minutes à 120° : I. comme à l'ordinaire placé nu dans un panier ; II. enveloppé d'une mince couche de coton ; III. enveloppé d'une couche de coton très épaisse.

Les numérations au réseau oculaire sur des préparations colorées par la technique classique de ZIEHL m'ont donné un enrichissement en Bacilles tuberculeux à peu près le même dans les trois cas. Les trois flacons contenant encore du liquide, j'ai, pour chacun, étalé et des flocons surnageants et le culot obtenu par centrifugation.

Voici ce que j'ai obtenu :

Examen microscopique direct, pour 500 carrés du réseau oculaire : 23 Bacilles.

Examen après chauffage à 120° pendant 20 minutes :

	Flocons surnageants	Culot de centrifugation
I. Flacon nu	41 Bacilles	86 Bacilles
II. Flacon légèrement enveloppé..	52 Bacilles	92 Bacilles
III. Flacon enveloppé d'une couche épaisse de coton.....	47 Bacilles	89 Bacilles

On pouvait espérer augmenter l'enrichissement des crachats en Bacilles tuberculeux par addition de lessive de soude (1 goutte par cm³) à des crachats dilués dans l'eau distillée avant d'être mis à l'autoclave.

En opérant sur des crachats bacillifères, j'ai pu constater non seulement l'absence d'enrichissement, mais une disparition totale des germes. Le crachat contenait des Bacilles tuberculeux et je n'ai pu en déceler dans le résidu d'homogénéisation.

Donc je suis d'avis qu'il faut s'en tenir à la simple stérilisation des crachats à l'autoclave, 20 minutes à 120°.

Le chauffage à 120° C détermine un enrichissement en Bacilles tuberculeux, ainsi que cela résulte des nombres suivants :

(Coloration par la technique classique de ZIEHL)

	Examen microscopique direct des crachats	Examen du dépôt obtenu après chauffage à 120°
Crachats A	8 Bacilles	36 Bacilles
Crachats B	16 Bacilles	55 Bacilles
Crachats C	32 Bacilles	102 Bacilles

Je propose le mode opératoire suivant :

Verser les crachats dans des tubes coniques à centrifuger, en verre Pyrex ; boucher au coton, porter 20 minutes à 120°.

Après stérilisation, centrifuger à la centrifugeuse électrique ou à son défaut à la centrifugeuse à main. Etaler le culot et colorer.

Cette technique est à la portée de tous les laboratoires, car tous possèdent au moins un autoclave.

INFLUENCE DE LA COLORATION SUR LES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES MÉTHODES DE CONCENTRATION

Les techniques de concentration des Bacilles tuberculeux ne donnent pas, comme j'ai pu l'observer, de résultats constants.

Pourtant, il est intéressant de rechercher dans quelles proportions certaines d'entre elles mettent en évidence un nombre de Bacilles supérieur à celui que révèle l'examen microscopique du frottis.

Seules, des numérations permettent d'établir le « *taux d'enrichissement* » fourni par les diverses techniques de concentration, c'est-à-dire le rapport du nombre des Bacilles après enrichissement au nombre des Bacilles trouvés dans le crachat original, les investigations portant sur des surfaces égales.

Dans ce but, j'ai fait des numérations sur des préparations colorées suivant des techniques diverses, afin de rechercher quelle influence pourrait avoir éventuellement la coloration sur les résultats fournis par les techniques de concentration.

Mais ici, plus encore que lorsqu'il s'agit de comparer seulement entre elles des techniques de coloration, les résultats ne peuvent être précis comme je désirerais qu'ils le fussent.

Il n'est pas possible, en effet, d'établir des comparaisons rigoureuses entre des préparations qui, faites de produits hétéromorphes (frottis de crachats et résidu de concentration) ne peuvent être forcément d'épaisseur absolument égale.

J'ai opéré de la façon suivante :

Après avoir dissocié mécaniquement par des perles de verres des crachats bacillifères, j'ai fait un certain nombre de préparations que j'ai colorées suivant des techniques différentes.

Puis j'ai procédé à la concentration du reste des crachats, suivant une ou plusieurs techniques et j'ai appliqué aux préparations du résidu de concentration les mêmes techniques de coloration qu'aux frottis des crachats.

J'ai entrepris alors des numérations au réseau oculaire sur l'un et l'autre groupe de préparations.

Pour cela, j'ai opéré comme je l'ai indiqué plus haut (1^{re} Partie, chapitre VIII et 2^e Partie, chapitre X) comptant les Bacilles de 500 carrés du réseau oculaire, à raison de 25 carrés par champ.

Voici quelques-uns des chiffres que j'ai trouvés :

Crachats G. — Hôpital

	Examen microsc. direct	Concentration Cordonnier	Concentration Bezançon et Philibert
Coloration suivant :			
SCHULTE-TIGGES	59 Bacilles	80 Bacilles	121 Bacilles
K. SPENGLER	58 Bacilles	69 Bacilles	99 Bacilles
BIOT	39 Bacilles	101 Bacilles	118 Bacilles
FRAENKEL-GABBET	20 Bacilles	54 Bacilles	158 Bacilles
ZIEHL	19 Bacilles	28 Bacilles	78 Bacilles
CÉPÈDE	12 Bacilles	Pas de préparation	164 Bacilles
LESIEUR, JACQUET et PINTENET	9 Bacilles	5 Bacilles	7 Bacilles
HERMAN	7 Bacilles	8 Bacilles	6 Bacilles

Le rapport des chiffres obtenus : 1° à l'examen direct et 2° après concentration, en considérant des préparations colorées de la même façon, représente ce que l'on peut appeler le « *taux d'enrichissement* » fourni par chaque technique. Voici ce taux :

	Rapport :	<u>Cordonnier</u>	<u>Bezançon et Philibert</u>
		Examen direct	Examen direct
SCHULTE-TIGGES		1,3	2,05
K. SPENGLER		1,18	1,6
BIOT		2,6	2,
FRAENKEL-GABBET		2,7	2,92
ZIEHL		1,5	4,1
CÉPÈDE		»	13,6
LESIEUR, JACQUET et PINTENET		0,55	0,77
HEBMAN		1,1	0,85

Crachats G. — Hôpital

	Examen micros. direct	Concentration Renaux	Rapport :	<u>Renaux</u>
				examen direct
Coloration suivant :				
FRAENKEL-GABBET	78 Bacilles	123 Bacilles		1,57
BIOT	24 Bacilles	43 Bacilles		1,78
SPENGLER-TRIBONDEAU ...	24 Bacilles	89 Bacilles		3,29
ZIEHL	21 Bacilles	47 Bacilles		2,23

Crachats S. V. — Hôpital

	Examen micros. direct	Concentration Schmitz-K. Brauer	Concentration Ellermann et Erlandsen
Coloration suivant :			
K. SPENGLER	70 Bacilles	244 Bacilles	234 Bacilles
SCHULTE-TIGGES ..	80 Bacilles	226 Bacilles	212 Bacilles
BENDER	78 Bacilles	242 Bacilles	192 Bacilles
ZIEHL	71 Bacilles	230 Bacilles	207 Bacilles
MAZZARELLI	14 Bacilles	19 Bacilles	23 Bacilles
		Rapport <u>Schmitz-K. Brauer</u>	Rapport <u>Ellermann-Erlandsen</u>
		examen direct	examen direct
K. SPENGLER		3,48	3,34
SCHULTE-TIGGES		3,02	2,65
BENDER		2,78	2,46
ZIEHL		3,23	2,9
MAZZARELLI		1,3	1,64

Crachats S. P. — Hôpital

	Examen micros. direct	Concentration Despeignes	Rapport : <u>Despeignes</u> Examen direct
Coloration suivant :	—	—	—
SPENGLER-TRIBONDEAU	9 Bacilles	32 Bacilles	3,55
FRAENKEL-GABBET	6 Bacilles	31 Bacilles	5,16
BAYARD	5 Bacilles	27 Bacilles	5,4
ZIEHL	8 Bacilles	36 Bacilles	4,5
BIOT	8 Bacilles	42 Bacilles	5,25
LESIEUR, JACQUET et PINTENET	4 Bacilles	7 Bacilles	1,75
BENDER	7 Bacilles	36 Bacilles	5,14

Crachats S. A. — Hôpital

	Examen micros. direct	Concentration Despeignes	Rapport : <u>Despeignes</u> Examen direct
Coloration suivant :	—	—	—
ZIEHL	16 Bacilles	55 Bacilles	3,44
FRAENKEL-GABBET	15 Bacilles	48 Bacilles	3,2
SPENGLER-TRIBONDEAU ...	21 Bacilles	76 Bacilles	3,61
BENDER	23 Bacilles	58 Bacilles	2,51
SCHULTE-TIGGES	27 Bacilles	61 Bacilles	2,22
BIOT	17 Bacilles	53 Bacilles	2,52

Ces résultats sont assez inattendus ; il semblerait que le taux d'enrichissement dût être le même, quelle que soit la coloration employée. Quelle explication peut-on donner de ces différences ? Le traitement des crachats par les diverses méthodes de concentration modifie certainement la colorabilité du microbe, c'est-à-dire son affinité pour le colorant. Or les plastides qui ont perdu une partie de leur affinité pour les colorants peuvent encore être colorés par des agents à pouvoir tinctorial intense tels que la fuchsine ; tandis que ces mêmes plastides traités par des colorants à pouvoir tinctorial faible restent incolores et par conséquent passent inaperçus.

Ainsi se trouve démontrée encore la supériorité de toutes les techniques qui utilisent la liqueur de ZIEHL sur celles qui ont recours à d'autres colorants.

Les taux d'enrichissement constatés ici avec des techniques de concentration prises parmi celles qui m'ont donné les meilleurs résultats sont en général peu élevés.

CONCLUSIONS

Les résultats que j'ai obtenus à la suite d'expériences longuement et patiemment poursuivies sur la coloration et la concentration des Bacilles tuberculeux dans les crachats me permettent de conclure :

1° En ce qui concerne les méthodes de coloration :

a) Les techniques utilisant la fuchsine phéniquée comme colorant des Bacilles méritent seules de fixer l'attention. Les Bacilles sont très nettement et très intensément colorés sur les préparations;

b) La technique classique de ZIEHL, la plus ancienne, reste pour la pratique courante une des meilleures. Entre les mains d'expérimentateurs exercés, elle donne de bons résultats.

c) Les techniques de coloration utilisant l'acide picrique comme colorant de contraste (techniques de SPENGLER, TRIBONDEAU, BENDER, SCHULTE-TIGGES, BIOT) sont recommandables aussi. La facilité d'examen sur fond jaune varie avec l'observateur.

2° Les techniques de concentration des Bacilles tuberculeux dans les crachats, généralement préconisées, ont, à mon avis, des défauts nombreux :

a) Quelles que soient les méthodes de concentration qu'on emploie, les résultats obtenus sont inconstants.

Le « taux d'enrichissement » que m'ont fourni les techniques considérées parmi les meilleures fut bien inférieur à celui qu'on leur attribue généralement, c'est peut-être que je n'ai jamais expérimenté ces techniques que sur des crachats qui avaient été préalablement l'objet d'un examen microscopique direct très minutieux ;

b) Elles sont, en général, longues et désagréables. Les méthodes

de « lyse » permettent le développement de germes microbiens divers dont la présence est un obstacle à l'observation du seul Bacille tuberculeux. Les crachats, séjournant à l'étuve à 37° dégagent une odeur de putréfaction ;

c) Les méthodes de concentration présentent presque toutes un inconvénient fort grave sur lequel l'attention n'a jamais été suffisamment attirée et tel que, même si elles donnaient de bons résultats, elles n'en seraient pas moins à écarter dans la pratique courante : elles exposent l'expérimentateur aux risques de la contamination, car elles comportent pour la plupart, des triturations en vase ouvert. L'opérateur le plus adroit et le plus prudent n'est donc pas à l'abri des projections possibles de particules virulentes.

d) La technique de DESPEIGNES très simple, réalisant la stérilisation des crachats, peut être essayée en cas d'examen microscopique direct négatif.

3° Si les numérations sur préparations colorées ne peuvent donner que des résultats approximatifs, du moins la numération des Bacilles tuberculeux au réseau oculaire est préférable à la numération par champ ;

4° Toutefois l'examen microscopique des frottis de crachats colorés suivant une bonne technique, examen minutieux, prolongé à la platine mobile, a beaucoup de valeur.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

COLORATION

(1) ARLOING et R. BIOT. — Sur la coloration des granulations du Bacille de KOCH. (Technique de C. Biot au Ziehl-formol). (*Bull. Société d'Etudes scientifiques sur la Tuberculose*, t. 3, f. 4, 12 juin 1913, p. 83).

(2) ARONSOHN. — Beziehungen zwischen Tuberkulose u. Krebs. (*Deutsche med. Woch.*, t. 37, 1902, n° 47, p. 842).

(3) AUCLAIR et PARIS. — Constitution chimique du Bacille de KOCH et de sa matière unissante, ses rapports avec l'acido-résistance. (*C. R. Académie des Sciences*, t. 149, 4 février 1907, p. 278).

(4) BAUMGARTEN. — Ueber ein bequemes Verfahren Tuberkelbacillen in Sputis nachzuweisen. (*Centralbl. f. med. Wiss.*, t. 20, 1882, p. 433).

(5) BAUMGARTEN. — Beiträge zur Darstellungsmethode der Tuberkelbacillen. (*Zeitschr. f. Wissensch. Mikroskopie und f. Mikroskop. Technik*, 1884, t. 1, p. 51).

(6) BAYARD. — De la décoloration de la liqueur de Ziehl dans l'examen direct du Bacille de Koch dans les crachats. (*Bull. Sciences pharmacologiques*, t. 15, n°s 3-4, mars-avril 1918, p. 91).

(7) BENDER. — Zur Technik des Nachweises der Tuberkelbacillen im Sputum. (*Centralbl. f. Bakt., O.*, t. 86, 1921, p. 461).

(8) BETEGH (Von). — Neue differential diagnostische Farbenmethode für Tuberkel Perlsucht und andere säurefeste Bacillen nebst Strukturstudien bei verschiedenen säurefesten Bakterienarten. (*Centralbl. f. Bakt., O.*, t. 47, 1908, p. 654).

(9) BIENSTOCK. — Zur Frage der sogenannten Syphilis Bacillen und der Tuberkelbacillen Färbung. (*Fortsch. d. Med.*, t. 4, 1886, p. 193).

- (10) BIOT (C). — Voir ARLOING et R. BIOT.
- (11) BITTER. — Ueber Syphilis und Smegma Bacillen. (*Virchow Archiv.*, t. 101, 1886, p. 209).
- (12) BORREL. — Tuberculose pulmonaire expérimentale. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. 7, 1893, p. 593).
- (13) BORREL. — Bacilles tuberculeux et paratuberculeux. (*Bull. Institut Pasteur*, t. 2, 1904, p. 409).
- (14) CALMETTE (A). — L'Infection bacillaire et la Tuberculose chez l'Homme et chez les Animaux. (*Masson et Cie éditeurs, Paris 1922*, p. 15).
- (15) CAMUS et PAGNIEZ. — Acides gras et Bacille tuberculeux. (*Presse médicale*, t. 13, n° 9, 30 janvier 1905, p. 65).
- (16) CARNET MÉDICAL FRANÇAIS. — Juin 1924, p. 694. Une nouvelle technique de coloration des Bacilles de la Tuberculose : le procédé de MAZZARELLI. (*La Riforma medica* 1924, p. 280).
- (17) CÉPÈDE. — Coloration du Bacille de KOCH dans les crachats par le lacto-bleu. (*C. R. Académie des Sciences*, t. 164, 25 février 1918, p. 357).
- (18) CIACCIO. — Sur l'acido-résistance du Bacille de KOCH. (*C. R. Société de Biologie*, t. 60, 24 mai 1906, p. 585).
- (19) DOUTRELEPONT et SCHUTZ. — Ueber Bacillen bei Syphilis. (*Deutsche med. Woch.*, t. 20, n° 10, 1885, p. 320).
- (20) EHRLICH. — Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. (*Archiv. f. mikroskop. Anatomie*, t. 13, 1876, p. 263).
- (21) EHRLICH. — Aus dem Verein für Mediz. von 1^{er} mai 1882. (*Deutsche med. Woch.*, t. 17, 1882, p. 269).
- (22) EHRLICH. — Referat und Discussion über die gegen R. KOCH' schen Entdeckung der Tuberkelbacillen neuerlichst hervorgetretenen Einwände. (*Deutsche med. Woch.*, t. 18, 1883, p. 159).
- (23-24) EHRLICH. — Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung. (*Charité Annalen Berlin*, t. 2, 1886, p. 123).
- (25) FONTES. — Untersuchungen über die chemische Natur der den Tuberkelbacillen, einigen Fett- und Wachsarten und über das Phänomen der Säureresistenz. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 49, 26 février 1909, p. 317).

(26) FRAENKEL. — Ueber die Färbung des Koch'sche Bacillus und seine semiotische Bedeutung für die Krankheiten der Respirationorgane. (*Berlin-Klinische Wochs.*, t. 21, n° 13, 31 mars 1884, p. 193).

(27) FUTTERER. — Ueber eine Modification der EHRlich 'schen Farbenmethode für Tuberkelbacillen im Gewebe. (*Archiv. f. patholog. Anatomie und Physiologie und f. Klinische Med.*, t. 101, 1885, p. 198).

(28) GABBET. — Rapid staining of the tubercle Bacillus. (*The Lancet*, t. 133, 9 avril 1887, p. 757).

(29) GASIS. — Ueber eine neue Reaktion der Tuberkelbacillen und eine darauf begründete differenzial diagnostische Färbungsmethode derselben (*Centralb. f. Bakt. O.*, t. 50, 1909, p. 111).

(30) GIACOMI (DE). — Die diagnostische Bedeutung des Nachweises der Tuberkelbacillen im Stuhl. (*Fortschr. d. Med.*, t. 1, 1883, p. 145).

(31) GIACOMI (DE). — Färbung der Syphilisbacillen. (*Schweiz Corresp.*, t. 15, 1885, p. 12).

(32) GIBBES. — A rapid method of demonstrating the tubercle Bacillus without the use of nitric acid. (*The Lancet*, t. 125, 5 mai 1883, p. 771).

(33) GOTTSTEIN. — Bemerkungen über das Färbungsverhalten von Mikroorganismen durch Salzlösungen. (*Fortsch. d. Med.*, t. 3, n° 19, 1885, p. 264).

(34) GOTTSTEIN. — Die Beeinflussung des Farbenhatens von Microorganismen durch Fette. (*Fortsch. d. Med.*, t. 4, 1886, p. 252).

(35) HAMMERSCHLAG. — Bakteriologische Chemische Untersuchungen über Tuberkelbacillen. (*Centralbl. f. klin. Med.*, t. 12, 1891, p. 1).

(36) HELBIG. — Erklärungs Versuch für die specifische Färbbarkeit der Tuberkelbacillen. (*Deutsche med. Woch.*, t. 36, 1901, p. 133).

(37) HERMAN (de Mons). — Sur la coloration du Bacille tuberculeux. (*Annales Institut Pasteur*, t. 22, f. 1, 25 janvier 1908, p. 92).

(38) HERMANN. — Neue Methode der Kernfärbung. (*Tageblatt d. Naturf. in Graz*, 1875, p. 115).

(39) KLEIN. — Zur Kenntniss der Verbreitung des Bacillus Tuberkuloses. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 28, 1900, p. 111).

(40) KOCH (Robert). — Untersuchungen über Bakterien. (*Beitrag z. Biologie d. Pflanzen von Cohn*, t. 2, 1877, p. 428).

(41) KOCH (Robert). — Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. (*Mitth. a. d. Kais. Gesundheitsamt.*, t. 1, 1881, p. 317).

(42) KOCH (Robert). — Ueber Tuberkulose. Vortrag. geh. in. d. physiolog. Gesellschaft. Berlin 24 märz 1882. (*Virchow. Archiv.*, t. 81, 1882, p. 193).

(43) KOCH (Robert). — Die Ætiologie der Tuberkulose. (*Mitth. a. d. Kais. Gesundheit.*, t. 2, 1884, p. 1).

(44) KOCH (Robert). — Ueber neue Tuberkulinpräparate. (*Deutsche med. Woch.*, t. 32, 1897, p. 209).

(45) KONGSTED (E.). — Vergleichende Untersuchungen über die Methoden von HERMANN und von ZIEHL zu Färbung der Tuberkelbacillen. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 84, 1921, p. 513).

(46) KONRICH. — Eine neue Färbung für Tuberkelbacillen. (*Deutsche med. Woch.*, t. 55, 1^{er} juillet 1920, p. 741).

(47) KRONBERGER. — Ein neue einfache Strukturfärbung für die echten sauerfesten, speziell für die Tuberkulosesecreger. (*Beiträge z. Klin. d. Tub.*, t. 15, 1910, p. 157).

(48) KUHNE. — Die Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbacillen. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 8, 1890, p. 293).

(49) LESIEUR, JACQUET et PINTENET. — Sur un procédé simple de coloration des crachats tuberculeux. (*C. R. Société Biologie*, t. 82, 15 mars 1919, p. 251).

(50) LICHTHEIM. — Zur diagnostischen Verwertung der Tuberkelbacillen. (*Fortschr. d. Med.*, t. 1, 1883, p. 4).

(51) LORION. — Les méthodes bacilloscopiques dans le diagnostic de la Tuberculose pulmonaire. (*Thèse Médecine Paris 1923-24, Paris, Jouve et C^{ie} éditeurs*, p. 79).

(52) LUISI. — Su di un nuovo metodo di colorazione del Bacillo di Koch (*Annali d'Igiene*, t. 32, mai 1922, p. 236).

(53) LUSTGARTEN. — Die Syphilis Bacillen. (*Wien. med. Woch.*, n° 47, 1885, p. 347).

(54) LUTZ. — Zur Morphologie der Mikroorganismus der Lepra. (*Dermat. Studien. herausgeg. von UNNA 1886*) cité par UNNA « Die Entwicklung der Bakterienfärbung ». (*Centralbl. f. Bakt.*, O., t. 3, 1888, p. 191).

(55) MARMORECK. — Beitrag zur Kenntniss der Kultur u. Färbung der Tuberkelbacillen. (*Zeitschr. f. Tuberkulose*, t. 1, 1900, p. 444).

(56) MUCH. — Die nach ZIEHL nicht darstellbaren Formen des Tuberkelbacillus. (*Berlin, klin. Woch.*, t. 45, n° 14, 6 avril 1908, p. 691).

(57) MÜLLER. — Ueber Tuberkelbacillen und Sporenfärbung unter Anwendung von Kalciumpercarbonate und Wasserstoffsuperoxyde. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 291, 1901, p. 791).

(58) NEELSEN. — Zur Färbung der Tuberkelbacillus. (*Fortsch. d. Med.*, t. 3, 1885, p. 201).

(59) ORTH. — Notizen zur Farbetechnik. (*Berliner klinische Woch.*, t. 20, 1883, p. 421).

(60) PAPPENHEIM. — Befund von Smegmabacillen in menschlicher Lungen Auswurf. (*Berlin. klin. Woch.*, t. 38, n° 37, septembre 1901, p. 809).

(61) PETRI. — Zur Färbung des Koch'shen Bacillen in Sputis sowie über das gleiche Verhalten einiger Pilzzellen. (*Berlin. klin. Woch.*, t. 20, 26 novembre 1883, p. 739).

(62) PORGES. — Ueber eine neue Färbungsmethode der Tuberkelbacillen im Sputum. (*Münch. med. Woch.*, 1916, t. 63, p. 1164).

(63) RINDFLEISCH. — Färbung des Tuberkelbacillen. (Sitzungsberichte der physikalisch. medicinische Gesellschaft z. Würzburg. Dezemb. 1882). (*Deutsche med. Woch.*, t. 18, 1883, p. 16).

(64) RONDELLI et BUSCARONI. — Ueber eine neue Färbungsmethode des Tuberkelbacillus. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 21, 1897, p. 70).

(65) RUPPEL. — Zur Chemie der Tuberkelbacillen. (*Zeitschr. f. phys. Chemie*, t. 26, 1898, p. 218).

(66) SCHULTE-TIGGES. — Zur Tuberkelbacillenfärbung. (*Deutsche med. Woch.*, t. 55, n° 44, 28 octobre 1920, p. 1225).

(67) SOLLIER et DAVIDOVITCH. — Etude comparative des méthodes de coloration de ZIEHL-NEELSEN, SCHULTE-TIGGES et CÉPÈDE pour la mise en évidence du Bacille de Koch dans les crachats. (*Bull. Société des Sciences médicales et biologiques de Montpellier*, 1924, p. 62).

(68) SPEHL. — Double-Coloration du Bacille de Koch par la méthode de SPENGLER modifiée. (*C. R. Société de Biologie*, t. 80, 9 mars 1918, p. 248).

(69) SPENGLER (Karl). — Neue Farbe Methoden für Perlsucht und Tuberkelbacillen. (*Deutsche med. Woch.*, t. 33, n° 9, 1907, p. 337).

(70) SPINNA. — Untersuchungen über die Entfärbbarkeit der mit anilinen Farben tingirten Bakterien. (*Allgm. Wiener med. Zeitschr.*, n°s 15 et 16, 1885, pp. 169 et 181).

(71) TRIBONDEAU. — Note sur la coloration des Bacilles tuberculeux par le procédé de ZIEHL-NEELSEN. (*C. R. Société Biologie*, t. 81, 20 octobre 1917, p. 780).

(72) UNNA. — Zur Färbung der Leprabacillen. (Leprastudien 1886) cité par UNNA : « Die Entwicklung der Bakterienfärbung. (*Centralb. f. Bakt.*, O., t. 3, 1888, p. 193).

(73-74) UNNA. — Die Entwicklung der Bakterienfärbung. (*Centralb. f. Bakt.*, O., t. 3, 1888, p. 124).

(75) WEIGERT. — Zur Technik der mikroskopische Bakterienuntersuchungen. (*Virchow Archiv.*, t. 84, 1881, p. 275).

(76) WEIGERT. — Neue Mittheilungen über die Pathogenie der acuten allgemeinen Miliartuberkulose. (*Deutsche med. Woch.*, t. 18, 1883, p. 349).

(77) WEISS. — Ueber eine neue Färbungsmethode des Tuberkelbacillus. (*Zeitschrift f. Tuberkulose*, t. 30, 1919, p. 330).

(78) ZIEHL. — Zur Färbung des Tuberkelbacillus. (*Deutsche med. Woch.*, t. 17, n° 33, 12 août 1882, p. 451).

(79) ZIEHL. — Zur Lehre von Tuberkelbacillen insbesondere über deren Bedeutung für Diagnose und Prognose. (*Deutsche med. Woch.*, t. 18, 1883, p. 62).

(80) ZIEHL. — Ueber die Färbung der Tuberkelbacillus. (*Deutsche med. Woch.*, t. 18, 1883, p. 247).

CONCENTRATION

(81) ALLÈGRE. — Du diagnostic précoce de la tuberculose pulmonaire par l'homogénéisation des crachats. (*Thèse Médecine*, Toulouse, année 1918-1919, juillet 1919, p. 37).

(82) AMAN. — Der Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. (*Centralb. f. Bakt.*, O., t. 17, n° 15, 1895, p. 513).

(83) ARRIGO (d') et STAMPACCHIA. — Beitrag zum Studium der Tuberkulose. (*Centralb. f. Bakt.*, t. 23, 1899, p. 123).

(84) BARBERIO. — Sulla preparazione e sull' uso dell' Antiformina. (*II Policlinico Roma*, t. 21, 1914, p. 126).

(85) BEITZKE. — Die Anreicherungsverfahren zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. (*Hyg. Rundschau*, t. 12, f. I, 1902, p. 12).

(86) BERGERON et LETULLE. — Revue critique des techniques expérimentales et cliniques applicables à la tuberculose. (*Revue de la Tuberculose*, 3^e série, t. 5, n° 1, 1924, p. 23).

(87) BERNHARDT. — Ueber die Verwendung von Antiformin und Ligoïn für der Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. (*Berlin klin. Woch.*, t. 46, 19 août 1909, p. 1428).

(88) BEZANÇON, GRIFFON et PHILIBERT. — Recherche du Bacille tuberculeux dans le sang par homogénéisation du caillot. (C. R. *Société Biologie*, t. 55, 10 janvier 1903, p. 35).

(89) BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT. — Adaptation de la technique d'homogénéisation de BEZANÇON et PHILIBERT à l'usage des dispensaires antituberculeux. (*Revue de la Tuberculose*, 3^e série, t. 2, n° 6, décembre 1921, p. 326).

(90) BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT. — I. Augmentation apparente du nombre des Bacilles tuberculeux en voie de putréfaction.

II. Application au diagnostic de la tuberculose pulmonaire de l'enrichissement en Bacilles tuberculeux des crachats mis à l'étuve. (C. R. *Société Biologie*, t. 86, 25 mars 1922, p. 680).

(91) BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT. — Autolyse des crachats tuberculeux à 50°. (C. R. *Société Biologie*, t. 87, 16 juin 1922, p. 62).

(92) BEZANÇON et PHILIBERT. — Importance de la notion de densité pour la recherche du Bacille de Koch par les procédés d'homogénéisation du crachat. (*Progrès médical*, 13 mai 1911, p. 229).

(93) BEZANÇON, PHILIBERT et GASTINEL. — Importance clinique de la méthode d'homogénéisation des crachats pour le diagnostic de la tuberculose. (*Bull. Société médicale Hôpitaux*, 3^e série, t. 33, novembre 1912, p. 1467).

(94) BIEDERT. — Ein Verfahren den Nachweis verinzelter in Tuberkelbacillen zu sichern nebst Bemerkungen über der Farbarkeit den Bacillen und Œtiologie der Tuberkulose. (*Berlin klin. Woch.*, t. 23, n° 42, 18 octobre 1886, pp. 713-717).

(95) BIEDERT. — Zur Diagnose und Behandlung der Tuberkulose. (*Berlin. klin. Woch.*, t. 28, n° 2, 1891, pp. 31-33).

(96) BIEROTTE. — Vergleichende Untersuchungen über den Wert der Antiformin u. s. w. (*Berlin. klin. Woch.*, t. 47, n° 19, 9 mai 1910, p. 877).

(97) BIERRY. — Sur la recherche des Bacilles tuberculeux dans les crachats. (*C. R. Académie des Sciences*, t. 163, 1916, p. 110).

(98) BIERRY. — Sur la recherche des Bacilles tuberculeux dans les expectorations et les divers liquides de l'organisme et sur la recherche des fibres élastiques. (*C. R. Académie des Sciences*, t. 163, 1916, p. 618).

(99) BRAUER (KURT). — Ein neues Verfahren zur Anreicherung von Tuberkelbacillen im Sputum. (*Deutsche med. Woch.*, t. 53, 7 mars 1918, p. 266).

(100) CALMETTE. — L'Infection bacillaire et la Tuberculose chez l'Homme et chez les Animaux. (*Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris 1922*, chapitre I, p. 23).

(101) CALMETTE. — Id., chapitre II, p. 44.

(102) CALMETTE, BOQUET et NÈGRE. — Manuel technique de Microbiologie et Sérologie. (*Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris 1925*, p. 536).

(103) CAUSSADE et M^{me} CRIBIER. — Comparaison des méthodes de recherche des Bacilles de Koch dans les crachats. (*Bulletins et Mémoires Société médicale Hôpitaux de Paris*, 3^e série, t. 47, 18 janvier 1923, p. 18).

(104) CORDONNIER. — Note sur une méthode d'enrichissement par histolyse des crachats pour la recherche du Bacille tuberculeux. (*Bull. Sciences pharmacologiques*, t. 14, 1917, p. 7).

(105) CORONE. — L'homogénéisation des crachats tuberculeux. (*Thèse Médecine Montpellier*, année 1912-1913, 14 mai 1913, p. 39).

(106) COURATTE-ARNAUDE. — Nouvelle méthode pour la recherche du Bacille de Koch dans les crachats et le pus. (*Gazette hebdomadaire de la Société de Médecine de Bordeaux*, n° 49, 1902, p. 591. — *Gazette des Hôpitaux*, 11 décembre 1902, p. 1381).

(107) CZAPLEWKI. — Zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. (*Zeitschr. f. Tuberkulose*, O., n° 6, 1900, p. 387).

(108) DARBÈS. — Sur quelques procédés récents d'homogénéisation des crachats. (*Thèse Médecine Bordeaux*, année 1921-22, 16 décembre 1921, p. 41).

(109) DESPEIGNES. — Nouvelle technique pour la préparation des crachats destinés à la recherche du Bacille de Koch. (C. R. *Société Biologie*, t. 84, 29 janvier 1921, p. 182).

(110) DILG. — Untersuchungen über die verschiedenen Sedimentirverfahren zum Nachweis von Tuberkelbacillen. (*Centralbl. f. Bakt.*, O., t. 35, 18 décembre 1908, p. 387).

(111) DISTASO. — An improved technik for the staining of sputum for tubercle Bacilli. (*The Lancet*, t. 198, 3 janvier 1920, p. 19).

(112) DITTHORN (FRITZ) et W. SCHULTZ. — Anreicherungsverfahren für den Nachweis von Tuberkelbacillen im Sputum. (*Centralbl. f. Bakt.*, O., t. 79, 31 mars 1917, p. 166).

(113) ELLERMANN (de) et ERLANDSEN. — Nachweis von Tuberkelbacillen im Sputum. (*Zeitschr. f. Hyg.*, t. 69, f. 2, 6 octobre 1908, p. 219).

(114) FAISCA. — Sur un nouveau procédé de concentration du Bacille tuberculeux dans les crachats. (C. R. *Société Biologie*, t. 84, 21 mai 1921, p. 1002).

(115) FAVRE et DEVUNS. — Sur l'homogénéisation des crachats tuberculeux par auto-digestion spontanée. (C. R. *Société Biologie*, t. 85, 7 novembre 1921, p. 858).

(116) FONTÈS. — De la recherche du Bacille de la Tuberculose dans les crachats et du calcul des Bacilles en les rapportant à un poids déterminé de matériel. (*Mém. d. Inst. Osw. Cruz., Rio-de-Janeiro*, t. 6, f. 3, 1914, p. 221).

(117) FOUREST. — Procédé simple et rapide de recherche des Bacilles de KOCH dans les expectorations par homogénéisation et enrichissement. (C. R. *Société Biologie*, t. 88, 24 février 1923, p. 516).

(118) GAUSSEL et CRONE. — L'homogénéisation des crachats pour la recherche des Bacilles tuberculeux. (*Bull. Sciences médicales de Montpellier*, 1913, p. 203).

(119) GIRAUD (M^{lle} Marthe) et DARBIEN. — Recherche du Bacille tuberculeux dans les expectorats fluidifiés par la pyridine. (C. R. *Société Biologie*, t. 79, 18 novembre 1916, p. 976).

(120) GERRERES. — Ueber den Nachweis des Tuberkelbacillus im Sputum mittels den Antiforminmethode. (*Zeitschr. f. klin. Med.*, t. 22, 1910, p. 86).

(121) GORESCU (G.). — Nouveau procédé d'enrichissement des Bacilles tuberculeux dans les crachats. (C. R. *Société Biologie*, séances de la Société roumaine, t. 86, 1922, p. 889).

(122) GUELMÉ et HOUAL. — Procédé spécial pour la recherche du Bacille de Koch dans les crachats sans centrifugation. (*Bull. médical Paris*, t. 33, 24 mai 1919, p. 271).

(123) GRYSEZ et BERNARD. — Un procédé d'homogénéisation des produits tuberculeux (crachats, pus, fèces) par la bile. (C. R. *Société Biologie*, t. 83, n° 35, 4 décembre 1920, p. 1506).

(124) HAMMERL. — Ein Beitrag zur Homogenisierung des Sputums. (*Münch. med. Woch.*, t. 56, 1909, p. 1955).

(125) HASERODT. — Neue Methoden zum Nachweis von Tuberkelbacillen im Sputum. (*Hyg. Rundschau*, t. 20, n° 12, 1909, p. 699).

(126) HEMPEL. — Untersuchung über den Nachweis von Tuberkelbacillen und ihre Zählung im Sputum. (*Inaugural Dissertation, Leipzig*, 1902).

(127) HIRTZMANN. — Procédé de recherche du Bacille de Koch dans les produits organiques tuberculeux. (C. R. *Société Biologie*, séance de la Société de Biologie de Nancy, t. 84, n° 15, 30 avril 1921, p. 803).

(128) HUNE. — Antiformin zu Anreicherung der Tuberkelbacillen im Auswurf Stuhl, Urin, u. s. w. (*Hyg. Rundschau*, t. 9, 1908, p. 1090).

(129) HUNE. — Die Tuberkelbacillen Anreicherung mittels Antiformin. (*Deutsche med. Woch.*, t. 44, n° 4, 1909, p. 791).

(130) JACOBSON. — La recherche du Bacille de Koch par la méthode de l'Antiformine-ligroïne. (C. R. *Société Biologie*, t. 67, 13 novembre 1909, p. 507).

(131) JOCHMANN. — Ueber neuere Nährboden zur Züchtung des Tuberkulosesecregers, sowie über neues Anreicherungsverfahren u. s. w. (*Hyg. Rundschau*, t. 10, n° 20, 1900, p. 269).

(132) JOUSSET (D^r A.). — Nouvelle méthode pour isoler le Bacille de Koch des humeurs de l'organisme. (*Semaine médicale*, n° 3, 21 janvier 1903, p. 22).

(133) JOUSSET (D^r A.). — L'Inoscopie. (*Archives de Médecine expérimentale*, mars 1903, p. 289).

(134) KETEL (VAN). — Beitrag zu Untersuchung auf Tuberkelbacillen. (*Archiv. f. Hyg.*, t. 15, 1892, p. 109).

(135) KHOURI. — Enrichissement des crachats tuberculeux au moyen de l'hypobromite de sodium. (*Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1^{er} février 1921, p. 43).

(136) KOCH (Th.). — Die Anreicherungsverfahren der Tuberkelbacillen im Sputum nebst einem weiteren Beitrag. (*Centralb. f. Bakt.*, t. 83, 1919, p. 351).

(137) KORBSCH. — Voir STEICH et PIETSCH.

(138) KOSLOW. — Äther acetonische Kombination der Antiforminmethode. (*Berlin Klin. Woch.*, t. 47, n° 25, 20 juin 1910, p. 1181).

(139) KUHNE. — Die Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbacillen. (*Centralb. f. Bakt.*, O., t. 8, 23 novembre 1890, p. 293).

(140) LAGREZE. — Zur Antiforminmethode der Sputumuntersuchung. (*Deutsche Med. Woch.*, t. 36, n° 2, 1910, p. 72).

(141) LANNOISE (de) et GIRARD. — Nouvelle méthode pour la recherche du Bacille tuberculeux dans les crachats et le pus. (*Congrès contre la Tuberculose*, Naples, 25-28 avril 1900). (*Presse Médicale*, t. 13, n° 36, 5 mai 1900, p. 167).

(142) LAROCHE (Guy) et VIRMEAUX. — Recherche du Bacille de Koch par homogénéisation des crachats sans centrifugation. (*C. R. Société Biologie*, t. 81, 23 novembre 1918, p. 1085).

(143) LÖFFLER. — Ein neues Anreicherungsverfahren zum färberischen Nachweise spärlicher Tuberkelbacillen. (*Deutsche med. Woch.*, t. 36, n° 43, 27 octobre 1910, p. 1987).

(144) LORENZ. — Ergänzung der Antiforminmethode zur Anreicherung der Tuberkelbacillen. (*Berlin, klin. Woch.*, t. 48, n° 3, 1911, p. 118).

(145) LUCAS (A.). — Amélioration du procédé d'homogénéisation des crachats par la lessive de soude. (*C. R. Société Biologie*, t. 71, n° 36, 20 décembre 1912, p. 648).

(146) LUCAS (A.). — De l'homogénéisation des crachats, son importance pour le diagnostic de la Tuberculose pulmonaire. (*Thèse Médecine Paris*, année 1912-1913, p. 39).

(147) MEYER. — Zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum mittels Antiformin. (*Tuberculosis*, t. 8, n° 2, 1909, p. 71).

(148) MULHÄUSER. — Ueber das BIEDERT'sche Verfahren zum Nachweis von Tuberkelbacillen. (*Deutsche med. Woch.*, t. 17, 1891, p. 282).

(149) NAKAO-ABE (Kyoto). — Der Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. (*Archiv. f. Hyg.*, t. 67, f. 4, 1908, p. 372).

(150) NEBEL. — Ueber der Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. (*Archiv. f. Hyg.*, t. 47, 1904, f. 1, p. 57).

(151) NEMMSER et MARTOS LISSOWSKA. — Zur Untersuchung des tuberkuloseverdächtigen Sputums. (*Deutsche med. Woch.*, t. 37, 1911, p. 1697).

(152) PAPACOSTAS et GATÉ. — L'homogénéisation des crachats par l'eau de Javel. (*C. R. Société Biologie*, séance de la Société de Biologie de Lyon, t. 89, 17 décembre 1923, p. 1306).

(153) PATERSON. — A report on the use of Antiformin for the detection of tubercle Bacilli in Sputum. (*Journal of medical Research*, t. 22, mars 1910, p. 315).

(154) PAULUS. — Sur le procédé de SPENGLER pour la recherche du Bacille de la Tuberculose dans les crachats. (*Semaine médicale*, 1895, p. 180).

(155) PFEIFFER (Robert) et WALTER ROBISTCHEK. — Ein neues Tuberkelbacillen Anreicherungsverfahren mit Mastixemulsion. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 87, 1922, p. 27).

(156) PHILIPP. — On an improved methode for the detection of tubercle Bacilli in Sputum. (*Edinburgh medical Journal*, t. 32, 1886, p. 409).

(157) QUENSEL. — Ein neues Sedimentirungsverfahren zur Untersuchung von Tuberkelbacillen im Sputum. (*Nordiskt. medicinskt Arkiv.*, t. 2, f. 1, n° 22, 1901, p. 1).

(158) RENAUX (de Bruxelles). — Sur l'homogénéisation des crachats tuberculeux et la recherche du Bacille de KOCH dans le pus d'abcès froids et d'adénites suppurées, et dans les urines. (*C. R. Société de Biologie*, séance de la Société Belge de Biologie, t. 84, 1921, p. 834).

(159) RONCHÈSE. — Méthode rapide et sensible de recherche par homogénéisation des Bacilles de KOCH dans les crachats. (*C. R. Société Biologie*, t. 90, 18 janvier 1924, p. 9).

(160) ROSENKRANZ. — Ist zur Anreicherung von tuberkulösen Sputum Antiformin nötig ? (*Munch. med. Woch.*, t. 69, n° 12, 24 mars 1922, p. 434).

(161) SABRAZÈS. — Bacilles de KOCH des crachats tuberculeux autolysés en vase clos. (*C. R. Société de Biologie*, t. 87, 16 décembre 1922, p. 1281).

(162) SACHS MÜCKE. — Ein Hilfsmittel bei Sedimentirungsverfahren. (*Munch med. Woch.*, t. 53, n° 50, 1906, p. 2446).

(163) SCHMITZ et KURT BRAUER. — Versuche mit neuen Fällungsverfahren zum Nachweis von Tuberkelbacillen im Sputum. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 81, O., 31 mai 1918, p. 359).

(164) SEEMANN (Osw.). — Die Brauchbarkeit des Antiformins zum Nachweis von Tuberkelbacillen. (*Berliner klin. Woch.* t. 46, 5 avril 1909, p. 628).

(165) SOPAKAR. — The cultivation of the tubercle Bacillus directly from sputum and post mortal material. (*Indian Journal of medical Research*, t. 4, juillet 1916, p. 28).

(166) SPEHL. — Homogénéisation des crachats par l'eau de chaux. (*C. R. Société Biologie*, t. 81, 9 mars 1918, p. 250).

(167) SENGLER. — Pankreatinverdauung des Sputums zum Sedimentiren der Tuberkelbacillen. (*Deutsche. med. Woch.*, t. 21, n° 15, 1895, p. 244).

(168) STEICH et PIETSCH. — Ueber eine für den prastischen Arst verwandbare Anreicherungs-methode der KOCH'schen Bacillen im Sputum. (*Mediz. Klinik.*, t. 18, n° 39, 24 septembre 1922, p. 1256).

(169) STRAUS. — La Tuberculose et son Bacille. (*Paris*, 1895, Rueff et C^{ie}, éditeurs, p. 145).

(170) STROSCHER. — Beiträge zur Untersuchung tuberkulösen Sputums. (*Mitteil. von Brehmer's Heilanstalt*, 1889, p. 285).

(171) THOMAS. — La recherche du Bacille tuberculeux dans les différents milieux. Nouveau procédé d'homogénéisation et de collection. (*Thèse Pharmacie Bordeaux*, année 1917-18, 18 juillet 1918, p. 35).

(172) UHLENHUTH et XYLANDER. — « Antiformin » ein bakterienlösendes Desinfektionsmittel. (*Berlin. klin. Woch.*, t. 45, 20 juillet 1908, p. 1346).

(173) UHLENHUTH. — Ueber neuere Methoden der Sputumuntersuchung. (*Deutsche med. Woch.*, t. 50, n° 23, 1909, p. 1047).

(174) UNNA. — Discussion über Lupus. (*Verhandlung des. internat. medic. Congresses Kopenhagen*, 1884), cité par UNNA « Die Entwicklung der Bakterien farbung. (*Centralbl. f. Bakt.*, t. 3, O., 1888, p. 313).

(175) UNNA. — Die Entwicklung der Bakterienfarbung. (*Centralbl. f. Bakt.*, O., t. 3, O., p. 313).

(176) WENDRINER. — Zur mikroskopischen Untersuchung des Harns auf organische Sedimentbestandteile. (*Allgem. med. Centralzeitung*, t. 58, n° 8, 1889, p. 161).

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	7
-------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

Méthodes de coloration

CHAPITRE PREMIER. — Etalement, fixation, généralités	11
CHAPITRE II. — Historique des colorations	14
CHAPITRE III. — Acido-résistance du Bacille tuberculeux.....	26
a) Membrane	26
b) Constitution du corps bacillaire.....	28
CHAPITRE IV. — Etude comparative des différents procédés de coloration. Conditions d'expérimentation. Classification	31
CHAPITRE V. — Techniques utilisant la fuchsine phéniquée.....	34
Préparation de la liqueur de Ziehl Neelsen.....	34
1. Techniques utilisant des décolorants acides.....	35
2. Techniques utilisant des décolorants alcalins.....	39
3. Techniques comportant un renforcement de la couleur des bacilles	41
4. Techniques utilisant la décoloration et la coloration de contraste	42

CHAPITRE VI. — Technique utilisant d'autres colorants que la fuchsine	45
1. Bleu de méthylène.....	45
2. Colorants violets.....	46
3. Eosine	48
CHAPITRE VII. — Critique des techniques de coloration.....	50
CHAPITRE VIII. — Comparaison de quelques techniques récentes avec la technique de Ziehl.....	52

DEUXIÈME PARTIE

Méthodes de concentration

CHAPITRE PREMIER. — Généralités, but des méthodes de concentration	59
CHAPITRE II. — Aperçu historique	62
CHAPITRE III. — Essai des diverses méthodes de concentration du Bacille tuberculeux dans les crachats.	
Classification. Conditions générales d'expérimentation.....	67
CHAPITRE IV. — Méthodes utilisant des produits alcalins.....	70
Lessive de Soude :	
a) <i>Collection par centrifugation</i>	71
b) <i>Collection à la surface</i>	74
c) <i>Homogénéisation sur lames</i>	77
Hypochlorites. — I. Eau de Javel :	
a) <i>Collection par centrifugation</i>	78
b) <i>Collection à la surface</i>	79
II. Antiformine :	
a) <i>Collection du culot de centrifugation ou du sédiment</i>	81
b) <i>Collection à la surface</i>	84
c) <i>Epuisement par l'éther</i>	86
d) <i>Homogénéisation sur lames</i>	86

Produits alcalins divers :

1. Borate de soude et acide borique.....	87
2. Ammoniaque	88
3. Sublimé et chlorure de sodium.....	89
4. Eau de chaux.....	89
5. Hypobromite de soude.....	90

CHAPITRE V. — Méthodes utilisant des produits divers..... 91

1. Chloroforme et grenaille de plomb.....	91
2. Acide phénique.....	91
3. Eau oxygénée.....	92
4. Alcool à 95°.....	93
5. Pyridine	93
6. Mastic en larmes.....	93

CHAPITRE VI. — Méthodes de Digestion artificielle..... 95

1. Pancréatine	95
2. « Suc gastrique » fluoré.....	96
3. Bile	96

CHAPITRE VII. — Méthodes de « Lyse » des crachats..... 99

1. « Lyse » obtenue à la température ordinaire.....	99
2. « Lyse » à température ordinaire avec addition de glycérine	100
3. « Lyse » hâtée par la chaleur.....	100

CHAPITRE VIII. — Transformation des crachats à température
élevée 102

CHAPITRE IX. — Procédés mixtes 104

1. Action de la chaleur et précipitation de la mucine.....	104
2. Liquéfaction et précipitation	104
3. Liquéfaction et précipitation chimique.....	105
4. Coagulation suivie de liquéfaction.....	107
5. Homogénéisation des produits de « Lyse » des crachats à 37° C.....	109
6. Homogénéisation par la soude après séjour à l'autoclave à 120° C.....	109

CHAPITRE X. — Critique des méthodes de concentration.....	110
1. Homogénéisation sur lames.....	110
2. Collection à la surface.....	111
3. Collection d'un culot de centrifugation ou d'un sédiment..	112
4. Résumé des recherches personnelles.....	120
CHAPITRE XI. — Etude de la technique de Despeignes.....	123
INFLUENCE DE LA COLORATION SUR LES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES MÉTHODES DE CONCENTRATION	126
CONCLUSIONS	131
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	133

Vu et bon à imprimer :

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

L. BRUNTZ.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie,

Ch. ADAM,

Membre de l'Institut.

